EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR STIMULIERUNG AN DER IMMUNREAKTION BETEILIGTER ZELLEN DES PFERDES DURCH PARAMUNITÄTSINDUCER, LEKTIN UND EQUINES HERPESVIRUS

Helmut Hechler

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547022_0060

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. DDr. h.c. A. Mayr

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR STIMULIERUNG AN DER IMMUNREAKTION BETEILIGTER ZELLEN DES PFERDES DURCH PARAMUNITÄTSINDUCER, LEKTIN UND EQUINES HERPESVIRUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Helmut Hechler
aus
Reutlingen

München 1981

Gedruckt mit Genehmigung der
Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. von Sandersleben
Referent: Prof. Dr. DDr. h.c. A. Mayr
Korreferent: Prof. Dr. U. Lösch

Tag der Promotion: 24. Juli 1981

UNIV. LEIDEN BIBL.

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Meinen Eltern

in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A	EINLEITUNG	1
B	SCHRIFTTUM	3
1.	Funktion der Lymphozyten bei der Infektionsabwehr	3
2.	Charakterisierung und Trennung von Lymphozyten	6
3.	Untersuchungen zur Funktion von T- und B-Lymphozyten beim Pferd	14
3.1.	Untersuchungen zur intrauterinen und neonatalen Bildung von T- und B-Lymphozyten in Verbindung mit der Aussage zur Immunitätslage des Neugeborenen	17
3.2.	Untersuchungen zur Klärung einfacher und kombinierter Immunmangelkrankheiten beim Fohlen	21
3.3.	Untersuchungen zur Immunitätslage gegenüber Infektionen	25
3.4.	Versuche zur medikamentellen Beeinflussung der Lymphozytenreaktivität	32

Seite

C E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N 35

1. Material und Methodik 35

1.1. Versuchspferde 35

1.2. Serologische Untersuchungen 36

1.3. Durchführung der Paramunisierung 38

1.4. Periphere Lymphozyten 39

1.4.1. Blutentnahme 39

1.4.2. Lymphozytenisolierung 39

1.4.3. Bestimmung der Lymphozytenzahl 41

1.4.4. Vitalitätsprüfung der Lymphozyten 41

1.4.5. Funktionelle Differenzierung der Lymphozyten 42

1.4.6. Funktionelle Trennung in T- und B-Lymphozyten 43

1.5. Im Lymphozytentransformationstest eingesetzte Substanzen 45

1.5.1. Mitogen (Phytohaemagglutinin, PHA) 45

1.5.2. Paramunitätsinducer 46

a) PIND-AVI 46

b) PIND-ORF 46

c) Kombination PIND-AVI mit PHA-P 47

Seite

1.5.3. Virus 48

a) Vermehrungsfähiges Rhinopneumonitisvirus (EHV_1) 48

b) Inaktiviertes Rhinopneumonitisvirus 48

1.6. Lymphozytentransformationstest 49

1.6.1. Lymphozytengesamtfraktion 49

1.6.2. Separierte T-Zellfraktion 52

1.6.3. Separierte B-Zellfraktion 52

1.6.4. Auswertung der Ergebnisse 53

1.7. Durchführung der Intrakutantests 54

1.7.1. Intrakutantest mit Phytohaemagglutinin 55

1.7.2. Intrakutantest mit PIND-AVI 55

1.7.3. Intrakutantest mit Rhinopneumonitisvirus 56

a) Vermehrungsfähiges Rhinopneumonitisvirus 56

b) Inaktiviertes Rhinopneumonitisvirus 57

2. Ergebnisse 58

2.1. Serologie 58

2.2. Differenzierung der T- und B-Lymphozyten im E-Rosettentest 61

Seite

2.3. Lymphozytentransformationstests 64

2.3.1. Lymphozytentransformationstest mit Phytohaemagglutinin-P 65

a) Lymphozytengesamtfraktion 65

b) T- und B-Lymphozyten 71

2.3.2. Lymphozytentransformationstest mit PIND-AVI 73

2.3.2.1. Nicht paramunisierte Pferde 73

a) Lymphozytengesamtfraktion 73

b) Separierte T-Lymphozyten 77

2.3.2.2. Paramunisierte Pferde 78

a) Lymphozytengesamtfraktion 78

b) Separierte T-Lymphozyten 8o

2.3.3. Lymphozytentransformationstest mit PIND-ORF 81

2.3.4. Lymphozytentransformationstest mit Rhinopneumonitisvirus 85

Seite

2.3.4.1. Lymphozytengesamtfraktion 86

a) Vermehrungsfähiges Rhinopneumonitisvirus 86

b) Inaktiviertes Rhinopneumonitisvirus 88

2.3.4.2. Separierte T- und B-Lymphozyten 9o

2.4. Intrakutantests 92

2.4.1. Intrakutantest mit Phytohaemagglutinin 92

2.4.2. Intrakutantest mit PIND-AVI 98

2.4.3. Intrakutantest mit Rhinopneumonitisvirus 1o4

a) Vermehrungsfähiges Rhinopneumonitisvirus 1o4

b) Inaktiviertes Rhinopneumonitisvirus 1o8

		Seite
D	BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	111
E	ZUSAMMENFASSUNG	122
F	SUMMARY	124
G	LITERATURVERZEICHNIS	126
	LEBENSLAUF	176

A Einleitung

Die Abwehr von Infektionserregern wird sowohl von unspezifischen Faktoren als auch von humoralen Antikörpern und von Immunzellen getragen. Die T-Lymphozyten mit ihrer komplexen Funktion sind hierbei von zentraler Bedeutung.

Als eine effektive Methode der Infektionsprophylaxe hat sich die Paramunisierung erwiesen (1o2, 1o3, 1o4, 1o5, 1o7, 1o8, 1o9, 178, 213).

In vorangegangenen Untersuchungen am Pferd (95, 19o) konnte nachgewiesen werden, daß es durch gezielten Einsatz des Paramunitätsinducers PIND-AVI gelingt, die Organmanifestation im Gefolge experimenteller und natürlich vorkommender Virusinfektion zu unterbinden und diesen Inducer als Infektionsprophylaktikum somit erfolgreich einzusetzen.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Untersuchung der Frage, inwieweit als Wirkungsmechanismus des Paramunitätsinducers PIND-AVI (1o6, 1o8, 178) am Pferd eine Lymphozytenstimulation nachzuweisen ist, die in vitro an isolierten Lymphozyten durch deren nicht antigenspezifische Transformation und in vivo

im Intrakutantest überprüft werden kann. Vergleichend dazu wurden alle Untersuchungen mit einem T-zellspezifischen Mitogen (Phytohaemagglutinin, PHA) sowie mit equinem Herpesvirus, Serotyp 1 (EHV_1, Rhinopneumonitisvirus), das vorwiegend zelluläre Immunitätsmechanismen stimuliert, durchgeführt.

B SCHRIFTTUM

1. Funktion der Lymphozyten bei der Infektionsabwehr

Der Warmblüterorganismus ist aufgrund seiner Spezialisierung in der Lage, das Eindringen pathogener Erreger über ein stufenweise sich aufbauendes Abwehrsystem zu beantworten. Über zunächst unspezifische Abwehrmechanismen wie Resistenzfaktoren, Bakterizidine, Interferon usw. wird die erste Front gebildet, die spezifische Abwehr eines körperfremden Antigens über die einsetzende Immunreaktion ist die letzte Abwehrmöglichkeit. Hierbei treten die Immunzelle (antigensensibilisierter T-Lymphozyt) und der Antikörper (Produkt der B-Lymphozyten nach Antigenkontakt) in Aktion. Eine Vielzahl interagierender Zellen mit kooperativen Querverbindungen ist in diese Abwehrprozesse eingeschlossen.
Sowohl die T-Zelle als Träger der zellulären Immunität einschließlich der verzögerten Hypersensibilität als auch die B-Zelle als Produzent der Antikörper und Träger der humoralen Immunität entstammen dem lymphopoetischen Zellsystem. Die Herkunft dieser beiden Lymphozytenklassen ist zwar eine gemeinsame Stammzelle, die Wege der Reifung jedoch sind unterschiedlich (34, 37, 51, 125, 127).
Der Thymus-assoziierte T-Lymphozyt wandert vom Knochenmark als Pre-T-Lymphozyt zum Thymus. Die Zelle reift

im Thymus, zirkuliert und lokalisiert sich in peripheren Immunitätsorganen wie spezifischen Bezirken der Milz und der Lymphknoten. T-Zellen sind langlebig, haben die Fähigkeit der wiederholten Zirkulation im Körper und sind verantwortlich für die zelluläre Immunantwort.
B-Lymphozyten (Knochenmarksabkunft) reifen unabhängig vom Thymus. Vermutlich im lymphatischen Gewebe von Darm und Tonsillen erfolgt ihre Differenzierung.
Sie sind nach Antigenkontakt durch Kooperation mit T-Lymphozyten über Blastzellbildung in der Lage, sich in antikörperbildende Plasmazellen zu differenzieren. Diese synthetisieren die verschiedenen Immunglobulinklassen, die als humorale Antikörper fungieren (4, 168).

Die T-Zellen beziehen Makrophagen, polymorphkernige Leukozyten sowie eosinophile und basophile Leukozyten in den zellulären Abwehrmechanismus ein. Darüberhinaus kooperieren sie im Antigenerkennungsstadium mit den B-Zellen und entwickeln die Memoryzellen.
Somit ist die T-Zelle in der Lage, eine Vielzahl von in vitro und in vivo Funktionen auszuüben (21, 154). Diesen Zellen kommt eine zentrale Rolle sowohl im Ablauf der Immunantwort, als auch der Resistenzreaktion zu. T-Zellen sind in der Lage, Makrophagen zu aktivieren, die eine Wirtsantwort im Sinne der Allergie vom verzögerten Typ induzieren, sie können antigenspezifische

und nichtantigenspezifische Mediatoren (Transferfaktor, Lymphokine) sezernieren, für bestimmte Zellen stimulierend, zerstörend oder reaktiv wirken. Zusammen mit B-Zellen und Makrophagen stimulieren sie die spezifische Antikörperreaktion, und können für virusinfizierte Zellen direkt zytotoxisch wirken (154, 2o2) . Es wurde nachgewiesen, daß wahrscheinlich die virusimmune T-Zelle mit direkter Zelltoxizität der wesentliche Faktor bei der Abwehr bestimmter Virusinfektionen ist, da hierbei humorale Antikörper erst später nachweisbar sind (217).

Erst durch die Untersuchungen an isolierten T-Lymphozyten wurden weiterführende Erkenntnisse gewonnen, die die Basis für ein besseres Verständnis der Mechanismen zellulärer Abwehr schufen und die enge Korrelation zwischen der Zellreaktion bei der Infektabwehr einerseits und dem Major-Histokompatibility-Komplex andererseits erkennen ließen.

Innerhalb der T-Zellen selbst existieren Populationen unterschiedlicher immunologischer Differenzierungsgrade und Kompetenz.

2. Charakterisierung und Trennung von Lymphozyten

B- und T-Zellen erscheinen im Lichtmikroskop morphologisch identisch, sodaß zu ihrer Differenzierung andere Trenn- und Identifizierungsverfahren eingesetzt werden müssen.
Die Notwendigkeit dazu entsteht vor allem aus der Erkenntnis, daß jede dieser Zellpopulationen verschieden in unterschiedliche Krankheits- und Abwehrprozesse involviert ist und weiterführende Aussagen dazu nur an isolierten Zellpopulationen erhalten werden können (1, 2, 35, 61, 88, 156, 214).
T- und B-Zellen verfügen über verschiedene Charakteristika ihrer Zellmembran. Die B-Zelle gilt als Oberflächenimmunglobulin-tragend (OIG). Diese OIG sind über direkte Immunofluoreszens darstellbar (148,195). Quantitative Untersuchungen ergaben, daß 5o ooo bis 15o ooo Moleküle OIG an der Zelloberfläche vorhanden sein können (147). Ebenso können Komplementrezeptoren, die ähnlich dem OIG an der Zellmembran beweglich erscheinen, im sogenannten Erythrozyten-Antikörper-Complement (EAC) - Rosettentest nachgewiesen werden (18, 88,93). In vergleichenden Untersuchungen, die MAYR und VOGEL (116) an Lymphozyten verschiedener Haustierspezies durchführten, bestand Übereinstimmung zwischen den nachgewiesenen Prozentsätzen von Lymphozyten mit Komplementrezeptoren und dem OIG-Nachweis.

Vor allem dieser EAC-Rosettentest wurde zur Identifizierung und Quantifizierung von B-Zellen erfolgreich eingesetzt (24, 88, 171, 186, 219).
Neben dieser Differenzierungsmethode berichten POLLIAK et. al. (144) von der morphologischen Unterscheidung der T- und B-Lymphozyten im Rasterelektronenmikroskop, die nach NEWELL et. al. (129) jedoch unzuverlässig ist.
Von verschiedenen Autoren (2oo, 22o) wird die unterschiedliche Oberflächenladung der Lymphozytenpopulation zur Trennung in der Elektrophorese ausgenützt.
Hinsichtlich des beschriebenen OIG ist nicht zweifelsfrei geklärt, ob nicht auch T-Zellen Träger dieses Globulins sein können. Sollten sie OIG tragen, so steht fest, daß dieses nur durch Techniken größerer Sensibilität als der direkten Immunofluoreszens erkennbar zu machen ist (6o) .
Die T-Zellen vieler Spezies sind befähigt, nicht antigenspezifische Rosetten oder Erythrozyten-Rosetten mit heterologen Erythrozyten zu formen. Für diesen sogenannten E-Rosettentest muß für die jeweils untersuchte Spezies die passende Spezies als Erythrozytenspender ermittelt werden. Die bislang beschriebenen Resultate verschiedener Labors variieren diesbezüglich sehr (116, 184).MAYR und VOGEL (116) sehen eine Ursache dafür neben der Verschiedenheit der ange-

wendeten Techniken in vorhandenen zytophilen Antikörpern. Die E-Rosettentechnik scheint bei den untersuchten Haussäugern bei weitem nicht alle T-Zellen zu erfassen (116). Enzyme, wie beispielsweise Neuraminidase, können den Prozentsatz nachweisbarer E-Rosetten erhöhen, andererseits - im Falle des Trypsins - auch reduzieren. Auch Zellgifte (z.B. Cyanid) reduzieren Untersuchungen von RADASZKIEWICZ (bei 116) zufolge die Prozentsätze nachweisbarer E-Rosetten bei landwirtschaftlichen Nutztieren.

Über die bislang beschriebenen gebräuchlichen Differenzierungs- und Isolierungsverfahren von T- und B-Zellen sowie die diesbezüglich untersuchten Spezies geben die Tabellen 1 bis 5 Auskunft.

Tabellen 1 bis 5 :

Übersicht über Verfahren der Differenzierung und Trennung von Lymphozyten

Tabelle 1

Differenzierung der T-Zellen mittels	Gewinnung der T-Zellen möglich	Referenz		Spezies
Spontanrosetten mit Erythrozyten	durch Sedimentation der T-Zell-Rosetten	BRAIN et.al.	1970	Mensch
		LAY et.al.	1971	-
		JONDAL et.al.	1972	-
		SEILER et.al.	1972	-
		BACH	1973	-
		BAXLEY et.al.	1973	-
		BENTWICH et.al.	1973	-
		ROSS et.al.	1973	-
		BROWN a. GREAVES	1974	-
		KAPLAN a. CLARK	1974	-
		ANTHONY et.al.	1975	-
		BROWN et.al.	1975	-
		EVANS et.al.	1975	-
		YU a. PEARSON	1975	-
		ALBERT et.al.	1977	-
		JOHANSEN et.al.	1974	Affe
		TARR et.al.	1977	Pferd
		VAUTHEROT et SALMON	1977	-
		MAYR u. SCHLEGER	1978	-
		FRYMUS a. SCHOLLENBERGER	1979	-

Differenzierung der T-Zellen mittels	Gewinnung der T-Zellen möglich	Referenz		Spezies
Spontanrosetten mit Erythrozyten	durch Sedimentation der T-Zell-Rosetten	GREWAL et.al.	1976	Rind
		FRUCHTMANN et.al.	1977	-
		TAKASHIMA et.al.	1977	-
		MAYR u. SCHLEGER	1978	-
		REEVES a. RENSHAW	1978	-
		PAWLAS	1979	-
		KAURA et.al.	1979	Büffel
		JOHANSEN et.al.	1974	Schwein
		ESCAJADILLO et.al.	1975	-
		SHIMIZU et.al.	1976	-
		KAUPP et.al.	1977	-
		MAYR u. SCHLEGER	1978	-
		REYERO et.al.	1978	-
		PAWLAS	1979	-
		ZANDER et.al.	1973	Hund
		BOWLES et.al.	1975	-
		TAYLOR et.al.	1975	Katze
		COCKERELL et.al.	1976	-
		STADECKER et.al.	1973	Meer-
		WILSON a. COMBS	1973	schwein-
		JOHANSEN et.al.	1974	chen
		COCKERELL et.al.	1976	Maus

Tabelle 2

Differenzierung der T-Zellen mittels	Gewinnung der T-Zellen möglich	Referenz		Spezies
T-Lymphozyten-spezifischer Antiseren		ALBERT et.al.	1977	Mensch
Adhärenz an Masern-virus-infizierte Zellen		VALDIMARSSON et.al.	1975	Mensch
Affinität zu Häm-agglutinin aus Helix pomatia	aus Helix pomatia-Agglutinin der Säule	HAMMARSTRÖM	1973	Mensch
		HAMMARSTRÖM et.al.	1973	-
		UHLENBRUCK et.al.	1973	-
		HAMMARSTRÖM et.al.	1975	-
		GÜRTLER a. CLEVE	1978	-
		HELLSTRÖM et.al.	1978	-
		HALLER et.al.	1977	Maus
		SWANBORG et.al.	1977	Ratte
Nachweis von -Naphtylacetat-Esterase		WITTING u. HARGANS	198o	Mensch
		MÜLLER et.al.	1975	Maus

Tabelle 3

Differenzierung der B-Zellen mittels	Gewinnung der T-Zellen möglich	Referenz		Spezies
Nylonfasersäule	B-Zellen haften adhäsiv an Nylonfasern, T-Zellen frei	EISEN et.al.	1972	Mensch
		GREAVES a. BROWN	1974	-
		WERNER et.al.	1977	-
		ROUSE a. BABIUK	1974	Rind
		GREWAL et.al.	1976	-
		ROUSE a. BABIUK	1977	-
		VAIMAN et.al.	1975	Schwein
		JULIUS et.al.	1973	Maus
"Panning"-Verfahren	Bindung der B-Zellen an mit Anti-IgG beschichteter Fläche, T-Zellen im Überstand	MAGE et.al.	1977	Maus
		WYSOCKI a. SATO	1978	-
	Bindung der B-Zellen an mit Anti-Ig beladene Glasperlen in Säule, T-Zellen frei	WIGZELL et.al.	1972	Rind
		FRUCHTMANN et.al.	1977	
	Bindung der B-Zellen an Sepharose	SCHLOSSMAN a. HUDSON	1973	

Tabelle 4

Differenzierung der B-Zellen mittels	Gewinnung der T-Zellen möglich	Referenz		Spezies
Pflanzenlektinen	Bindung der B-Zellen an pflanzliche Lektine, Gewinnung der nicht agglutinierten T-Zellen	GÜRTLER a. CLEVE REISNER et.al.	1978 1976	Mensch Maus
EAC-Rosettentest	B-Zellen bilden Rosetten, T-Zellen mittels Dichtegradient zu gewinnen	LAY a. NUSSENZWEIG JONDAL et.al. SEILER et.al. TARR et.al. LEW et.al. MAYR u. VOGEL PAWLAS MAYR u. VOGEL KAURA et.al. SHIMIZU et.al. PAWLAS MAYR u. VOGEL ZANDER et.al. BOWLES et.al. TAYLOR et.al.	1968 1972 1972 1977 1980 1980 1979 1980 1979 1976 1979 1980 1973 1975 1975	 Mensch - Pferd - - Rind - Büffel Schwein - - Hund - Katze

Tabelle 5

3. Untersuchungen zur Funktion von T- und B-Lymphozyten beim Pferd

Die immunologische Reaktivität der Lymphozytenpopulationen ist über den Bereich der Grundlagenforschung hinaus vor allem beim Haustier Gegenstand von Untersuchungen mit dem Ziel, Aussagen zur individuellen Abwehr- und Immunreaktion und zur Immunitätslage gegenüber definierten Antigenen treffen zu können. Dies gelingt mit mehr oder weniger guter Übereinstimmung zu klinischen Befunden (116,142,2o5). Zum Einsatz gelangten bisher in diesen Untersuchungen beim Pferd der in vitro Lymphozytentransformationstest sowie in vivo der Intrakutantest.

Lymphozytentransformationstest

Lymphozyten besitzen die Fähigkeit der Proliferation. Eine Möglichkeit zum Nachweis der Zellproliferation ist die Messung der Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Einbaurate. Bei den Untersuchungen zur DNA-Einbaurate der peripheren Lymphozyten von Pferd, Rind und Schwein ergaben sich deutliche tierartliche Unterschiede. Das Pferd liegt mit nur o,3 % synthetisierender Lymphozyten in der DNA-Syntheserate sehr nahe dem Menschen (114) und damit weit unter den Werten des Rindes, die bei 1,5 % liegen (68, 84, 111) . Die Werte des Schweines dagegen befinden sich normalerweise zwischen denen dieser beiden untersuchten Spezies (115).

Zur Proliferation der Lymphozyten werden verschiedene Lektine eingesetzt. Phytohaemagglutinin und Concanavalin sollen überwiegend T-Zell- und weniger B-Zellpopulationen stimulieren (7, 8, 22, 54, 57, 79, 92, 97, 131, 133, 143, 179) , Pokeweed-Mitogen dagegen gilt - ähnlich bakteriellen Endotoxinen (9, 23, 133, 138) - hauptsächlich als B-Zell-Mitogen.(185, 2o3, 2o4).

Intrakutantest

Die intradermale Applikation von Antigen kann eine allergische Hautreaktion vom verzögerten Typ auslösen, die als Ausdruck einer antigenspezifischen zellgebundenen Immunität gewertet wird. Gewöhnlich tritt der Höhepunkt der Reaktion zwischen 8 und 48 Stunden nach intradermaler Antigen-Applikation in Form meßbarer Hautdickenzunahmen auf, die in Folge eines vorwiegend mononukleären Zellinfiltrates entstehen. Pflanzenextrakte, wie Phytohaemagglutinin und Concanavalin A werden - wie schon angeführt - in vitro zur T-Zell-Lymphozytentransformation verwendet, sie sind jedoch auch in vivo nach intradermaler Applikation beim immunkompetenten Tier in der Lage, antigenunabhängige Hautreaktionen auszulösen (19,182). Hauttests mit Phytohaemagglutinin und Dinitrochlorobenzen wurden an immunologisch gesunden sowie an agammaglobulinämischen Pferden zur Prüfung der T-Zell-

reaktivität durchgeführt (182). Diese getesteten Pferde reagierten positiv, Araberfohlen mit kombinierter Immunmangelkrankheit (T- und B-Zelldefizit) dagegen ließen keine Hautreaktion erkennen (123). Fohlen reagierten im Hauttest gegenüber Antigen üblicherweise schwächer als erwachsene Pferde, diese Altersabhängigkeit ist auch bei anderen Spezies beobachtet worden (33,161). Aufgrund der Untersuchungen an Pferd (19, 33, 167) und Mensch (19, 56, 72, 146, 152,162, 177) kann die intrakutane Applikation von Phytohaemagglutinin als schneller in vivo-Test verwendet werden, um die Reaktionsfähigkeit der T-Zellen qualitativ zu erfassen.

Indikationen für derartige Untersuchungen am Pferd sind in folgenden Gruppen zusammengefaßt:

3.1. Untersuchungen zur intrauterinen und neonatalen Bildung von T- und B-Lymphozyten in Verbindung mit der Aussage zur Immunitätslage des Neugeborenen.

3.2. Untersuchungen zur Klärung einfacher und kombinierter Immunmangelkrankheiten beim Fohlen.

3.3. Untersuchungen zur Immunitätslage gegenüber Infektionen.

3.4. Versuche zur medikamentellen Beeinflussung der Lymphozytenreaktivität.

3.1. Untersuchungen zur intrauterinen und neonatalen Bildung von T- und B-Lymphozyten in Verbindung mit der Aussage zur Immunitätslage des Neugeborenen.

Auf die Abhängigkeit des Serumimmunglobulingehaltes neugeborener Fohlen von der ersten Kolostrumaufnahme und der Bildung und den Nachweis zirkulierender B-Zellen weisen Untersuchungen von McGUIRE and GRAWFORD (12o) und von FRYMUS and SCHOLLENBERGER (5o) hin.

Das Fohlen kommt ohne zirkulierende Immunglobuline zur Welt (28,31, 1oo, 145,158).Die maternalen Kolostralimmunglobuline werden vom Fohlen schnell absorbiert, der Vorgang beginnt unmittelbar nach der ersten Verdauung des Kolostrums mit Bevorzugung der IgG-Resorption. Das Absorptionsmaximum wird um die 16. Stunde post partum erreicht und nimmt dann rapide ab, so daß am 5. Lebenstag keine Resorption mehr nachweisbar ist (28,31,145,158). Zwischen der abnehmenden Absorptionsfähigkeit des Fohlendarmes und dem totalen Protein- und Immunglobulingehalt der Muttermilch besteht eine direkte Korrelation (28,157). Über die Gesamtheit der Laktationsperiode jedoch enthält die Stutenmilch unterschiedliche Konzentrationen der verschiedensten Immunglobulinklassen (118,136,196). Insgesamt sind bislang 8 Immunglobulinklassen beim Pferd beschrieben (153).

McGUIRE and CRAWFORD (120) untersuchten zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der Kolostrumaufnahme am Fohlen den totalen Gehalt an Serumglobulin der Klassen IgG, IgG (T), IgM, IgA und AI im Vergleich zum Gehalt der jeweiligen Immunglobulinklassen in der Muttermilch. Innerhalb dieser Untersuchungen ergab sich, daß zwischen dem Gehalt an Immunglobulinen der Stutenmilch und des Stutenserums kein qualitativer oder quantitativer Unterschied bestand. Demzufolge existiert keine selektive Sekretion bestimmter Immunglobulinklassen in das Kolostrum. Drei der in diesen Experimenten untersuchten Fohlen zeigten schon vor der ersten Kolostrumaufnahme IgM im Serum, ein Fohlen wies darüberhinaus auch geringe Mengen von Serum-IgG auf.

Nach Untersuchungen von PERRYMAN et. al. (141) sind Fohlen schon in utero ab dem 185. bis 300. Tage der Gestation in der Lage, in geringem Umfange auch IgG zu synthetisieren.

Den Untersuchungen derselben Autoren zufolge (141) konnten in Pferdefoeten unterschiedlichen Alters PHA-reaktive T-Lymphozyten aus Thymus, Milz und mononukleären Zellen des peripheren Blutes nachgewiesen werden. Die Stimulation mit PHA erbrachte für Thymuszellen ab 80. Tag, für mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut ab 140. Tag und für Milzzellen ab 200. Tag der Gestation positive Reaktionen im Lymphozytentransformationstest.

Von FRYMUS and SCHOLLENBERGER (44) wurde der Gehalt zirkulierender B- und T-Lymphozyten beim Fohlen in den ersten 5 Lebensmonaten untersucht. Vom 5. bis zum 2o. Tage p.p. lag der Prozentsatz an B-Lymphozyten im Mittel bei 5, um am 2o. Tage spontan anzusteigen, sodaß ab 4o.Tage ein Maximum bei etwa 15 % erreicht war. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung zu den zitierten Ergebnissen von McGUIRE and CRAWFORD (12o) über den Gehalt zirkulierender Immunglobuline beim Fohlen zum selben Zeitpunkt nach der Geburt. In den Untersuchungen von FRYMUS and SCHOLLENBERGER (44) ergab sich weiterhin, daß der Prozentsatz zirkulierender T-Lymphozyten bei den untersuchten Fohlen altersunabhängig zu sein scheint. Diese Resultate stehen im Gegensatz zu Beobachtungen bei Kindern (58) und Ferkeln (59), bei denen der Prozentsatz zirkulierender T-Lymphozyten mit dem Alter anstieg. Der Verlauf des T-Zellgehaltes der untersuchten Fohlen mom 5. bis 16o. Tage nach der Geburt weist starke Schwankungen auf, zu denen von den Autoren nur insofern Stellung genommen wird, als sie darauf hinweisen, daß es bislang bei allen untersuchten Spezies nicht gelang,

einen Mittelwert für zirkulierende T-Lymphozyten anzugeben. Hierfür seien sowohl individuelle Tagesschwankungen als auch methodische Differenzen innerhalb der Untersuchungen verschiedener Labors verantwortlich zu machen.

3.2. Untersuchungen zur Klärung einfacher und kombinierter Immunmangelkrankheiten beim Fohlen

Die essentielle Bedeutung eines funktionierenden Immunsystems innerhalb der Wirts-Abwehr ist durch Untersuchungen an immunodefizienten Menschen demonstriert worden. Die Defekte beim Menschen können auf B-Lymphozyten begrenzt sein mit daraus entstehender ungenügender Immunglobulinsynthese sowie auch T-Lymphozyten mit der Folge ausbleibender zellulärer Immunität betreffen oder schließlich beide Lymphozytenspezies erfassen, wie dies bei der kombinierten Immunmangelkrankheit der Fall ist.(5 1,17o). Betroffene Personen zeigen in allen Fällen eine deutlich ansteigende Infektionsanfälligkeit (17o). Untersuchungen am Pferd zufolge existieren bei dieser Spezies zur Zeit 5 Arten von Immunmangelkrankheiten (124,125,126,193).

Von McGUIRE et. al. (123, 124) und THOMPSON et. al. (193) wurde erstmals bei Araberfohlen eine sogenannte kombinierte Immunmangelkrankheit beschrieben, die dem autosomalen rezessiven Erbgang folgt (121, 122). Die Krankheit ist charakterisiert durch eine stark ausgeprägte Lymphopenie, das Fehlen von Lymphozyten in allen lymphoiden Organen, das Auftreten einer Hypo- oder Agammaglobulinämie und in der Regel Tod im Alter von der zweiten bis zur 2o. Lebenswoche aufgrund von Infektionen (5, 6, 12, 14, 122).

Von BANKS et. al. (15) und McGUIRE et. al. (126) wurde eine primäre Agammaglobulinämie beschrieben, die bei Vollblutfohlen nachgewiesen werden konnte. Diese Erkrankung ist durch einen totalen Mangel an B-Lymphozyten gekennzeichnet. Die T-Lymphozyten sind in diesem Falle sowohl quantitativ als auch funktionell voll erhalten.

McGUIRE et. al. (125) beschreiben eine Hypogammaglobulinämie als Folge ungenügenden Transfers der Kolostrum-Immunglobuline von der Mutterstute zum Fohlen. Diese Art der Immunmangelkrankheit scheint momentan die beim Fohlen am häufigsten auftretende zu sein. Sie ist ebenfalls mit einer hohen Frequenz klinisch manifester Infektionen assoziiert. Der ungenügende Kolostrumantikörpertransfer kann sowohl die Folge ungenügenden Saugens sein, als auch Folge ungenügender Immunglobulinquantität im Kolostrum oder Störungen der Persorption des Kolostralproteins seitens des Fohlens.

Ebenfalls von McGUIRE et. al. (125) ist eine zeitlich begrenzte Hypogammaglobulinämie beim Fohlen beschrieben, deren Ursache bislang noch nicht geklärt werden konnte. Auch diese Krankheit tritt vorwiegend beim Araber auf. Sie ist gekennzeichnet durch eine Verzögerung in der Synthese der Immunglobuline bis etwa zum 3. Lebensmonat mit der Folge erhöhter Dispositon für klinisch manifeste Virus- und Bakterieninfektionen.

Neben diesen 4 beschriebenen Formen konnte von PERRYMAN et. al. (139) sowie HODGIN et. al. (74,75) eine fünfte Form der Immunmangelkrankheit beobachtet

werden, die sich als selektiver Immunglobulin M-Mangel dokumentiert und ebenfalls mit klinisch manifesten Infektionen der Fohlen im Alter von 4 bis 8 Monaten einhergeht.

Eine Übersicht über alle bislang beschriebenen Störungen des Immunsystems beim Pferd gibt nachfolgende Tabelle 6.

Defekt	Rassen	Lymphozyten-transformation	Zahl der B-Lymphozyten	Funktion der T-Lymphozyten	Konzentration der Immunglobuline	
					IgM	IgG, IgA, IgG(T)
Kombinierte Immunmangelkrankheit	Araber Arabische Halbblüter	niedrig	null	beeinträchtigt	null	Unvermögen der Synthese, Konzentrationen niedrig oder fehlend im Alter von 3 Monaten
Primäre Agammaglobulinämie	Englisches Vollblut	normal	null	normal	null	Konzentrationen bis zum Alter von 3 Monaten abhängig vom Übergang der Kolostralantikörper
(zeitlich begrenzte) Hypogammaglobulinämie als Folge ungenügenden Transfers der Kolostralantikörper	alle	normal	normal	normal	normal	Fähigkeit zur Synthese, Konzentrationen während der ersten 2-3 Lebensmonate niedrig
Selektive IgM-Mangelkrankheit	wahrscheinlich alle	normal	normal	normal	niedrig oder fehlend	Fähigkeit zur Synthese, normale Konzentrationen im Alter von 3 Monaten, Konzentrationen davor abhängig vom Übergang der Kolostralantikörper

Tabelle 6 : Übersicht über bislang beschriebene Störungen des Immunsystems beim Pferd [in Anlehnung an PERRYMAN et.al. (139)] .

3.3. Untersuchungen zur Immunitätslage gegenüber Infektionen

Infektionen mit bestimmten Virusarten können sich in einer Depression der zellulären Immunität ausdrücken. Beispiele hierfür sind die Infektion mit Mumps (63), Rubella (132), Masern (176), Infektiöser Hepatitis (210) und Infektionen mit dem Laktat-Dehydrogenase-Virus (77). Beim Pferd wurden bislang lediglich experimentelle Untersuchungen zur Reaktivität der B- und T-Zellen nach experimenteller Infektion mit dem Virus der Infektiösen Anämie im Vergleich zu nichtinfizierten Kontrollpferden durchgeführt. Die Infektiöse Anämie ist eine lymphoproliferative Erkrankung, bei der sich der Wirt in einem permanenten Virämiestadium befindet, obgleich zirkulierende Antikörper vorhanden sind (119). Eine mögliche Erklärung für diese Viruspersistenz könnte ein virusinduzierter Lymphozytendefekt sein, der den Schutz durch das zelluläre Immunsystem unterdrückt. Untersuchungen, die BANKS and HENSON (13) zu diesem Problem anstellten, ergaben allerdings, daß weder eine reduzierte Lymphozytenzahl noch ein Defekt in der Lymphozytenfunktion bei experimentell mit Virus der Infektiösen Anämie infizierten Pferden nachzuweisen war. B- und T-Zellen erwiesen sich im Vergleich zu den nichtinfizierten Kontrollen hinsichtlich Anzahl und Funktion identisch. Somit ist zumindest für die untersuchten Fälle anzu-

nehmen, daß bei der Infektiösen Anämie kein B- oder T-Lymphozytendefekt in die Pathogenese der Erkrankung eingeschaltet ist.

Besonderes Interesse hinsichtlich der Untersuchungen zur Immunitätslage findet die Infektion mit Rhinopneumonitisvirus (EHV_1) beim Pferd. Im Ablauf dieser Infektionskrankheit, speziell in Fällen auftretenden Virusabortes, wird immer wieder beobachtet, daß auch hohe Titer humoraler virusneutralisierender Antikörper weder Schutz gegenüber Reinfektion noch Schutz vor auftretendem Virusabort bedeuten (32, 4o, 41, 55).

WILKS and COGGINS (2o8,2o9) sowie PACHCIARZ (135) wiesen experimentell nach, daß Pferde nach Rhinopneumonitisvirusinfektion eine zellvermittelte Immunität entwickeln. Aufgrund der Pathogenese dieser Infektion mit der Fähigkeit des Virus, sich unter Umgehung extrazellulärer Räume von infizierter Zelle zu infizierter Zelle fortzupflanzen, gewinnt die zellvermittelte Immunität eine besondere Bedeutung innerhalb der Infektabwehr (13o). Möglicherweise ist gerade im Hinblick auf die Verhütung des Virusabortes die zelluläre Immunität von ausschlaggebender Bedeutung.

Von WILKS and COGGINS (2o8) wurde die T-Zell-Transformation durch Rhinopneumonitisvirus an erwachsenen Pferden mit unterschiedlichen Titern virusneutralisierender, humoraler Antikörper sowie an antikörperfreien SPF-Fohlen nach experimenteller, intranasaler Infektion mit

einem Rhinopneumonitisvirusstamm untersucht. In den Lymphozytentransformationstests verwendeten diese Autoren Polyethylenglykoll-gereinigtes, hitzeinaktiviertes Virus. Von 16 seropositiven Ponies reagierten 4 im Lymphozytentransformationstest negativ, 6 untersuchte seronegative Ponies reagierten ebenfalls negativ. Die Autoren schließen daraus, daß manche Pferde die Rhinopneumonitisvirus-Infektion lediglich mit der Bildung humoraler Antikörper beantworten oder daß eine initiale T-Zellreaktion in vivo auftritt, die im weiteren Verlaufe bis zu einem nicht mehr nachweisbaren Spiegel absinkt, während zu diesem Zeitpunkt humorale Antikörper noch nachweisbar sind. SPF-Ponys reagierten gegenüber dem Virusantigen in diesen Lymphozytentransformationstests mit Stimulationsindizes bis 1,7, sodaß von den Autoren Werte darüber als spezifisch antigenbedingt angesehen wurden. Nach intranasaler Infektion konnte bei den infizierten Pferden ab dem 2. Tag p.i. eine spezifische Lymphozytentransformation nachgewiesen werden, die zwischen Tag 7 und Tag 15 p.i. ihren Höhepunkt erreichte. Die gleichzeitig mituntersuchte Reaktion der Lymphozyten gegenüber dem Zellantigen erbrachte folgendes Ergebnis: Bei Verwendung Polyethylenglycoll-gereinigter Zellen, die in Gegenwart von autologem Serum vermehrt worden waren, wurde eine völlige Hemmung im Lymphozytentransformationstest gegenüber dem Zellantigen festgestellt. Nach Einsatz serumfreier Zellen dagegen wurden Lymphozytentransformationsraten mit

hohen Stimulationsindizes beobachtet.

DUTTA and CAMPBELL (42) führten Untersuchungen zur Lymphozytentransformation mit Rhinopneumonitisantigen an Stuten durch, die sich entweder im letzten Drittel der Trächtigkeit befanden oder einen Monat vor diesen Untersuchungen virusspezifisch abortiert hatten. Diese Autoren verwendeten in ihren in vitro-Untersuchungen gereinigtes, durch ultraviolettes Licht inaktiviertes Virus. Die Versuche erbrachten Stimulationsindizes gegenüber Rhinopneumonitisvirus zwischen 1,6 und 10,8. Zwischen trächtigen Stuten, Stuten, die normal abfohlten sowie Stuten nach Virusabort konnte hierbei kein Unterschied festgestellt werden. Die gleiche Beobachtung galt hinsichtlich der Titer humoraler, virusneutralisierender Antikörper. In diesen Untersuchungen war es nicht möglich, eine direkte Korrelation zwischen Antikörpertitern und Stimulationsindizes im Lymphozytentransformationstest herzustellen. Die Autoren schließen aus ihren Ergebnissen, daß es momentan noch nicht möglich sei, von der zellulären Immunantwort, die in in vitro-Tests ermittelt werden kann, auf ihre Rolle innerhalb der Pathogenese des Virusabortes zu schließen.

GERBER et. al. (55) führten Lymphozytentransformationstests mit Verwendung eines vermehrungsfähigen, attenuierten Rhinopneumonitisvirusstammes (RAC-H) und des [illegible] an 6 Fohlen und 13 Stuten unterschiedlichen Alters (6 - 2[illegible]

Monate) durch. Diese Pferde waren vor Beginn der Tests mit einer handelsüblichen Rhinopneumonitis-vaccine (RAC-H, attenuiert) schutzgeimpft worden. Es handelte sich bei den Immunisierungen um Primo-vaccinationen, nicht vaccinierte Pferde dienten als Kontrolle. In diesen Untersuchungen wurde festgestellt, daß vermehrungsfähiges Rhinopneumonitisvirus im Lymphozytentransformationstest die Blastogenese nicht antigengeprägter T-Lymphozyten von nicht vaccinierten Pferden unterdrückte (Stimulationsindizes $\leq$ 1,0), jedoch nicht die Transformation immuner T-Lymphozyten von vaccinierten Pferden. Die T-Lymphozyten nicht vaccinierter Pferde reagierten dagegen geringgradig gegnüber inaktiviertem Rhinopneumonitisvirus. Die Autoren glauben, daß diese Reaktion Ausdruck eines rein mitogenen Effektes des inaktivierten Virus ist. Lymphozyten vaccinierter Pferde dagegen zeigten gleiche Transformationsraten gegenüber vermehrungsfähigem und inaktiviertem Rhinopneumonitisvirus. Da das vermehrungsfähige Virus keine unspezifische Transformation bewirkte und darüberhinaus deutlicher als inaktiviertes Virus zwischen der Reaktion vaccinierter und nichtvaccinierter Pferde differenzierte, wurden nur Ergebnisse, die mit vermehrungsfähigem Virus erhalten worden waren, gewertet. Von Interesse ist die Tatsache, daß in diesen Untersuchungen eine deutliche Korrelation zwischen der Entwicklung virusneutralisierender humoraler Antikörper

und der zellvermittelten Immunität in Abhängigkeit vom jeweiligen Alter der untersuchten Pferde nachgewiesen werden konnte. Pferde zwischen 18 und 21 Lebensmonaten (Zeitpunkt der Vaccination) wiesen signifikant bessere Antikörperbildung auf als jüngere Pferde. Dem lief jedoch keine zellvermittelte Immunität parallel. Pferde, die zwischen 6 und 8 Monaten vacciniert wurden, beantworteten die Impfung dagegen mit nur geringer Bildung humoraler Antikörper, zeigten jedoch, speziell nach der Revaccination, im Lymphozytentransformationstest signifikante Stimulationsindizes. Hinsichtlich der Bildung humoraler Antikörper und zellvermittelter Immunität bei trächtigen und nichtträchtigen Stuten ergab sich folgendes Wurden tragende oder nicht tragende Stuten im Experiment mit vermehrungsfähigem Rhinopneumonitisvirus belastet, reagierten sie unabhängig von der Gravidität mit signifikanter Antikörperreaktion. Die Lymphozytentransformationsraten gegenüber Rhinopneumonitisvirus lagen bei den trächtigen Stuten jedoch signifikant unter den Werten der nicht trächtigen Stuten (gemessen 1 und 8 Wochen nach der Infektion). Die Lymphozyten der 6 in diesen Untersuchungen infizierten trächtigen Stuten zeigten p.i. keine erhöhte Transformationsrate, während untersuchte männliche Tiere und nicht gravide Stuten einen deutlichen Anstieg der Transformationsraten nach experimenteller Infektion aufwiesen. Die Stimulationsindizes vaccinierter, trächtiger Stuten dagegen waren höher als

die nicht vaccinierter, nicht trächtiger Stuten. Kontrolluntersuchungen, die mit IBR-Virus des Rindes am Pferd durchgeführt wurden, erbrachten durchweg negative Ergebnisse.

Zur Untersuchung der zellulären Immunität gegenüber EHV_1 wurden von FRYMUS et. al. (49) an 1o natürlich infizierten Stuten (Aborte) Hauttests mit vermehrungsfähigem Rhinopneumonitisvirus (RAC-H, Hamsterleberantigen) durchgeführt. o,2 ml vermehrungsfähiges Virus wurden intradermal verabreicht, als Kontrollantigen diente Zellkulturflüssigkeit. Alle infizierten Stuten zeigten eine starke kutane Reaktion gegenüber dem Rhinopneumonitisvirus, Kontrollpferde reagierten auf die Applikation des gleichen Antigens negativ. Die Reaktion erreichte ihren Höhepunkt 24 Stunden nach Antigenapplikation. Die Autoren schließen daraus, daß es sich um eine Reaktion der Allergie vom verzögerten Typ handeln müsse, histologische Untersuchungen zur Erhärtung dieser Aussage wurden nicht durchgeführt.

3. 4. Versuche zur medikamentellen Beeinflussung der Lymphozytenreaktivität

Von MAGNUSON et. al. (99) wurde an Shetland-Ponys der Einfluß von Dexamethason auf die peripheren Lymphozyten geprüft. 2 Shetland-Ponys erhielten über die Dauer von 9 Tagen 1 mg Dexamethason/kg Körpergewicht intravenös verabfolgt. Wurden periphere Lymphozyten dieser Pferde mit Konzentrationen von o,ooo2 - 2oo µg Prednisolon inkubiert, so bewirkte dies ein exponentielles Absinken der ^{3}H-Thymidineinbaurate. Die Zugabe von Prednisolon zu den Lymphozytenkuluren verursachte dann eine Hemmung, wenn Prednisolon und PHA simultan inkubiert wurden. Wurden die Lymphozytenkulturen dagegen unmittelbar nach Prednisolonzugabe gewaschen, so konnte der suppressive Effekt des Coricosteroids verhindert werden. Der Grad der Hemmung der Phytohaemagglutinin-induzierten DNA-Synthese verhielt sich direkt proportional der Inkubationszeit mit Prednisolon. Parallel zu diesem Effekt war festzustellen, daß die Dexamethason-Injektionen einen rapiden Abfall der Anzahl zirkulierender Lymphozyten verursacht hatten. Der geringste Wert von 15 % zirkulierenden Lymphozyten wurde am 2. Tag nach der Dexamethason-Injektion registriert, Erholung trat innerhalb 24 Stunden ein. Gleichzeitig hatte die Corti-

coidgabe eine deutliche Abnahme der nicht immunglobulintragenden Lymphozyten in der Peripherie verursacht. Dies drückte sich vor allen Dingen in einer relativen Zunahme des Prozenzsatzes immunglobulintragender Zellen aus. Eine ähnliche Beobachtung war hinsichtlich der Zellen festzustellen, die C^3-Komplementrezeptoren an der Oberfläche tragen. Auch hier verhielten sich Zu- und Abnahme synchron zum Gehalt immunglobulintragender Lymphozyten.

STICKL und MAYR (178) wurden im Rahmen von Untersuchungen zur Wirksamkeit des Paramunitätsinducers PIND-AVI auf eine mögliche Lymphozyten-stimulierende Wirksamkeit dieses Präparates aufmerksam und prüften den Effekt im Lymphozytentransformationstest an Schweinelymphozyten. Diese Untersuchungen mit 8 verschiedenen PIND-AVI-Chargen erbrachten Stimulationsindizes von 2,7 bis 5,5 bei einer PIND-AVI-Verdünnung von 1:2o. Mit steigender Verdünnung des Paramunitätsinducers fielen die Stimulationsindizes kontinuierlich ab, bewegten sich aber selbst bei Inducer-Verdünnungen von 1:36o noch knapp im Stimulationsbereich. Der Grad der Stimulierbarkeit der Lymphozyten wurde von den Autoren anhand der Stimulationsindizes, die durch PHA bewirkt wurden, beurteilt. Die durch die Inducer-Chargen erreichten

Transformationsraten lagen durchweg etwas über den Werten, die mit der geringsten PHA-Dosis (o,1 γ) erreicht wurden.

Beim Menschen wird der zelluläre Abwehrapparat durch die Malignomkrankheit geschädigt, ein zusätzlicher tiefgreifender Schwund der T-Zellreaktivität erfolgt in der Regel durch die zytostatische Chemotherapie. Bei den von STICKL und MAYR (178) untersuchten Malignom-Patienten mit einer therapiebedingten T-Zellsuppression führte die Verabreichung von PIND-AVI fast immer zur Erhöhung der T-Zellreaktivität, die im Lymphozytentransformationstest anhand der Zellantwort gegenüber PHA festgestellt werden konnte.

C EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Material und Methodik

1. 1. Versuchspferde

Für die Untersuchungen standen 7 institutseigene Pferde beiderlei Geschlechts, unterschiedlichen Alters sowie verschiedener Rassen zur Verfügung. Diese Pferde waren in Einzelboxen untergebracht und erhielten Weidegang.

Darüberhinaus hatten wir die Möglichkeit, 9 erwachsene Pferde aus der Praxis und aus zwei Gestüten, die unter vergleichbaren Bedingungen gehalten wurden sowie 4 Saugfohlen im Alter von 2 bis 12 Tagen in die Versuche einzubeziehen.

Alle Pferde waren vor Beginn des jeweiligen Versuches einer klinischen Untersuchung unterzogen worden.

1. 2. Serologische Untersuchungen

Der Nachweis neutralisierender Antikörper gegenüber dem equinen Herpesvirus, Serotyp 1, erfolgte im Virusneutralisationstest (VNT) nach der Serumverdünnungsmethode in Mikroplatten (Greiner, Nürtingen). Die Reaktionsmengen betrugen jeweils o,o25 ml, für jede untersuchte Serumverdünnung wurden 4 Löcher der Mikroplatte eingesetzt.
Das Serum wurde in der Ausgangsverdünnung von 1:8 vorgelegt und in Zweierpotenzen weiterverdünnt. Danach wurde die adäquate Virusdosis (Rhinopneumonitisvirus, Stamm RAC-H, 26o. ENS-, 1o. RK_{13}-Passage, 1oo KID_{50}/o,o25 ml) hinzugegeben. Die Bindungszeit betrug 1 Stunde bei + 37° C. Nach Zugabe von o,o25 ml Zellsuspension (Permanente Kaninchennierenzellen, RK_{13}, Virusmedium: TC 199 mit 5 % foetalem Kälberserum) wurden die Mikroplatten steril abgedeckt und bei + 37° C unter CO_2-Spannung (5 %) bebrütet. Die Ablesung auf cytopathischen Effekt erfolgte täglich. Jedem Testansatz lief eine negative und eine positive Serumkontrolle sowie die Rücktitration der eingesetzten Virusdosis parallel. Die Endablesung

des VNT erfolgte am 1o. Tage, die Titerberechnung wurde nach der Methode von SPEARMAN und KÄRBER (173) vorgenommen. Serumtiter ab einer Verdünnung von 1:8 wurden positiv bewertet.

An den von uns paramunisierten Pferden wurden nach derselben Methode auch die neutralisierenden Antikörper gegenüber dem Avipox-Virus bestimmt. Die adäquate Virusdosis (Avipox-Virus, Stamm HP-1, 44o. FHE-Passage) betrug hier 8o bis 1oo KID_{50}/o,o25 ml, als Zellkultur wurden Hühnerembryofibroblasten (FHE, Virusmedium Earle MEM) eingesetzt.

1. 3. Durchführung der Paramunisierung

Die Pferde erhielten dreimal, beginnend 3 Tage vor dem jeweiligen Versuch täglich 4,o ml des Paramunitätsinducers PIND-AVI subkutan unter sterilen Bedingungen im Schulterblattbereich verabfolgt.
Der verwendete Paramunitätsinducer war nach der von MAYR (1o2, 1o6, 1o8) beschriebenen Methode im Institut hergestellt worden. Alle Versuche wurden mit PIND-AVI aus einer Charge durchgeführt. Als Lösungsmittel wurde sterile physiologische Kochsalzlösung verwendet.

1. 4. Periphere Lymphozyten

1. 4. 1. Blutentnahme

Die Lymphozyten wurden aus dem strömenden Blut (Vena jugularis) der Pferde gewonnen. Für die Blutentnahmen wurden NH_4 Heparinat-Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht) verwendet.

1. 4. 2. Lymphozytenisolierung

Für die Lymphozytenisolierung wurde das Dichtegradientenverfahren (25, 26, 134) in Anlehnung an die von TARGOWSKI (183) und VAN DAM et.al. (199) beschriebene Methode eingesetzt.

Die NH_4 Heparinat-Monovetten wurden nach der Blutentnahme zehnmal gekippt und 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Überstand (ca. 5 ml je 1o ml Blut) wurde abpipettiert und mit RPMI 164o-Medium (Seromed, München) 1:2 verdünnt. Das verwendete RPMI 164o war mit den folgenden Zusätzen versehen worden: 1 % o,2 M L-Glutamin, 2 g $NaHCO_3$, 2oo ooo I.E. Penicillin G und o,2 g Streptothenat auf 1ooo ml (= RPMI-

Gebrauchslösung).
2o ml Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala) wurden in Einmalzentrifugenbecher mit Schraubdeckel (Corning, New York) pipettiert und mit derselben Menge Überstand-RPMI-Gemisch sehr langsam und sehr vorsichtig überschichtet. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 25 Minuten bei 5oo g und Raumtemperatur.

Der über dem Ficoll-Paque-Gradienten befindliche schmale Lymphozytensaum wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt, in Einmalkappenröhrchen (Falcon, Oxnard) aufgenommen und in diesen Röhrchen dreimal mit RPMI-Gebrauchslösung für 1o Minuten bei 4oo g und Zimmertemperatur gewaschen. Es erwies sich als unbedingt erforderlich, das jeweilige Zellsediment sorgfältig zu resuspendieren.

Nach dem letzten Waschvorgang wurden die Lymphozyten in RPMI-Gebrauchsmedium mit 2o % hitzeinaktiviertem Pferdeserum resuspendiert und sofort weiterverwendet.

1. 4. 3. Bestimmung der Lymphozytenzahl

Nach gründlicher Resuspendierung der gewonnenen Zellsuspension wurden dieser einige Tropfen entnommen, in einer Leuko-Pipette mit 3 %iger Essigsäure verdünnt und in einer Neubauer-Kammer gezählt (1o1).

1. 4. 4. Vitalitätsprüfung der Lymphozyten

Die Prüfung der Lebensfähigkeit der isolierten Lymphozyten wurde mit 1 %iger Trypanblaulösung nach der bei BØYUM (26) beschriebenen Methode vorgenommen.
Nur wenn mehr als 95 Prozent lebende Zellen festgestellt werden konnten, wurde die Lymphozytensuspension weiterverwendet.

1. 4. 5. Funktionelle Differenzierung der Lymphozyten

Eine erste Unterscheidung der gewonnenen Lymphozyten in T- und B-Zellen wurde durch die Bestimmung des Anteils E-Rosetten-bildender T-Lymphozyten in Abwandlung der von MAYR und SCHLEGER (112) beschriebenen Methode vorgenommen.

Die isolierten Lymphozyten wurden auf eine Dichte von 4×10^6/ml eingestellt und o,2 ml dieser Zellsuspension mit derselben Menge einer 1 %igen Meerschweinchenerythrozytensuspension gemischt, nachdem die Erythrozyten vorher einer einstündigen Behandlung mit Neuraminidase (1:5 verdünnt mit PBS) bei + 37° C unterzogen worden waren. Anschließend wurde das Gemisch 15 Minuten bei + 37° C inkubiert, dann 5 Minuten bei 2oo g zentrifugiert und für 12 Stunden bei + 4° C inkubiert.

Zu o,2 ml des Ansatzes wurden danach 1 Tropfen o,5 %ige Methylenblaulösung gegeben, 2oo lebende Zellen in einer Thoma-Kammer gezählt und die Anzahl der E-Rosetten-bildenden Zellen in Prozent ermittelt. Nur Lymphozyten mit mehr als 3 gebundenen Erythrozyten wurden hierbei als Rosette gewertet.

1. 4. 6. Funktionelle Trennung in T- und B-Lymphozyten

Die isolierten Lymphozyten wurden anhand der bei WYSOCKI and SATO (215) sowie MAGE et.al. (98) an Mäuselymphozyten durchgeführten Methode in T- und B-Zellen getrennt.
Kaninchen-anti-Pferd-Immunglobulin G (Paesel, Frankfurt) wurde im Verhältnis von 1:5o mit o,o5 M Tris-HCl-Puffer (pH 9,5) verdünnt, danach 1o ml dieser Flüssigkeit in eine sterile Petrischale (Greiner, Nürtingen) pipettiert und durch sofortiges Bewegen gleichmäßig über die gesamte Bodenfläche verteilt.
Diese Petrischale wurde dann 4o Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (vor Sonnenlicht geschützt), anschließend der Überstand abgesaugt und die Schale zweimal mit PBS und einmal mit PBS mit 1 % FKS gewaschen. Die Waschflüssigkeiten wurden jeweils sehr vorsichtig mit einer Pipette an der Wand der Petrischale eingebracht und sofort verteilt.
Die Lymphozyten wurden gezählt und auf eine Zellkonzentration von 2 x $1o^6$/ml RPMI-Gebrauchsmedium eingestellt.

Jeweils 1o ml dieser Zellsuspension wurden in eine vorbehandelte Petrischale gegeben, sofort gleichmäßig verteilt und 4o Minuten unter o.a. Kautelen inkubiert. Danach erfolgte erneutes vorsichtiges Bewegen der Platte (Achtertouren in der Ebene) und weitere 3o Minuten Inkubation. Nach dieser Zeit wurde die Petrischale ein letztes Mal in der Ebene bewegt, der T-Zell-haltige Überstand mit der Pipette abgesaugt und in einem Einmalkappenröhrchen aufgenommen.
Zur Gewinnung von B-Zellen war es nötig, die Konzentration Kaninchen-anti-Pferd-IgG auf eine Verdünnung von 1:1oo zu verringern. Damit war es möglich, die Intensität der Bindung der B-Zellen an das Polyethylenglycoll der Petrischalen soweit zu reduzieren, daß sie nach Abtrennung der T-Zellen durch Abwaschen (Gummirubber) selbst noch gewonnen werden konnten.

1. 5. Im Lymphozytentransformationstest eingesetzte Substanzen

1. 5. 1. Mitogen (Phytohaemagglutinin, PHA)

Im Lymphozytentransformationstest wurde Bacto-Phytohaemagglutinin P (PHA-P; Difco, Detroit), ein polysaccharidfreies Phytohaemagglutinin verwendet.
Die Trockensubstanz wurde den Herstellerangaben entsprechend aufgelöst und mit RPMI-Gebrauchsmedium (ohne Serum) im Verhältnis von 1:1o und 1:5o verdünnt, in kleine Portionen aufgeteilt und bis zur Verwendung im Test bei - 7o° C gelagert.
Zum Testansatz wurde die benötigte Menge PHA-P bei + 4° C aufgetaut, auf die Verdünnungen 1:1o, 1:5o, 1:1oo, 1:2oo, 1:5oo, 1:1ooo, 1:2ooo, 1:5ooo und 1:1oooo eingestellt und in den Vorversuchen eingesetzt.
In den Hauptuntersuchungen verwendeten wir PHA-P nur noch in den Verdünnungen 1:1oo, 1:5oo und 1:1ooo.

1. 5. 2. Paramunitätsinducer

a) PIND-AVI

Der Paramunitätsinducer PIND-AVI wurde im Institut hergestellt (1o2,1o6,1o8) und kam immer in derselben Charge zur Anwendung.
Die lyophilisierte Substanz wurde vor jedem Versuch frisch mit RPMI-Gebrauchslösung resuspendiert und auf die in den Tests verwendeten Verdünnungen 1:5o, 1:1oo, 1:5oo und 1:1ooo eingestellt.
Parallel zu den Versuchen mit dem Inducer wurde der Überstand von Hühnerembryofibroblastenkulturen (FHE, zweimal eingefroren und aufgetaut, Zentrifugation bei + 4° C und 8oo g), in denen das im PIND-AVI enthaltene Hühnerpockenvirus vermehrt wird, eingesetzt. Als weitere Kontrolle wurde Virusmedium (Earle MEM) verwendet.

b) PIND-ORF

Der ebenfalls im Institut entwickelte und hergestellte Paramunitätsinducer PIND-ORF (11o),

basierend auf dem den Parapocken zugeordneten Erreger der Pustulardermatitis der Schafe und Ziegen, kam analog PIND-AVI in einigen Tests zum Einsatz.

c) Kombination PIND-AVI mit PHA-P

Der Paramunitätsinducer PIND-AVI wurde in einigen Lymphozytentransformationstests zusammen mit Phytohaemagglutinin-P im Mischungsverhältnis von 1:2 eingesetzt. Die Ausgangsverdünnungen beider Substanzen betrugen jeweils 1:1oo.

1. 5. 3. Virus

a) Vermehrungsfähiges Rhinopneumonitisvirus

Vermehrungsfähiges, zellfreies Rhinopneumonitisvirus (EHV_1), Stamm RAC-H, 26o. ENS-, 1. RK_{13}-Passage, $1o^{4,75}$ KID_{50}/o,o25 ml wurde unverdünnt und in den Verdünnungen 1:2, 1:1o und 1:1oo in den Tests verwendet.

b) Inaktiviertes Rhinopneumonitisvirus

Mit o,o3 % Acetyläthylenimin (AEI) über 16 Stunden bei + 37° C inaktiviertes Rhinopneumonitisvirus (163) der unter a) beschriebenen Passage wurde gleichfalls unverdünnt und in den oben angeführten Verdünnungen mit RPMI-Gebrauchslösung im Lymphozytentransformationstest eingesetzt.

Parallel zu allen Versuchen mit Rhinopneumonitisvirus wurden zellfreier Überstand von RK_{13}-Zellen (zweimal tiefgefroren und aufgetaut, Zentrifugation bei + 4° C und 8oo g) unverdünnt und in Verdünnungen von 1:2, 1:1o und 1:1oo sowie Virusmedium (TC 199) eingesetzt.

1. 6. Lymphozytentransformationstest

Der Lymphozytentransformationstest wurde in Anlehnung an McGUIRE et.al. (123) sowie VAN DAM et. al. (199) im Mikroverfahren durchgeführt.

1. 6. 1. Lymphozytengesamtfraktion

Die isolierten Lymphozyten wurden gezählt, ihre Vitalität geprüft und mit RPMI 164o-Gebrauchslösung mit 2o % hitzeinaktiviertem Pferdeserum auf eine Zellzahl von 2 x $1o^6$/ml eingestellt.
1oo ul dieser Zellsuspension wurden mittels einer Pipetman-Pipette (Abimed, Düsseldorf) in eine Mikrotiterplatte (U-Form; Nunc, Wiesbaden) pipettiert. Zu der Zellsuspension kam dann die gleiche Menge der jeweiligen stimulierenden Substanz in der entsprechenden Gebrauchsverdünnung. Jeder Ansatz wurde dreifach ausgeführt.
Als Ausgangswert zur Berechnung der Stimulationsindizes wurden pro Lymphozytenspender 3 Löcher statt mit einer der Testsubstanzen lediglich mit RPMI-Gebrauchsmedium beschickt.
Die Platte wurde steril abgedeckt und 3 Tage bei

+ 37° C unter Begasung mit 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert.

Einen Tag vor Beendigung der Inkubationszeit wurden die Ansätze mit je o,o25 µCi (U-^{14}C)-Thymidin (Radiochemical Centre, Amersham) markiert, unter denselben Bedingungen weiter inkubiert und am folgenden Tag bei - 7o° C tiefgefroren.

Zur Ernte wurde die Mikroplatte bei + 4° C aufgetaut und die Zellen mit einem Automash-Zellerntegerät (Dynatech, Nürtingen) auf Filterpapierstreifen gesaugt.

Das in die DNS der Lymphozyten eingebaute makromolekulare Thymidin bleibt dabei im Filter hängen, das nicht eingebaute wird durchgesaugt.

Der Filterstreifen wurde mit Hilfe eines Föhns 15 Minuten getrocknet, mit einem 1:2 Gemisch aus Aqua destillata und Methanol gewaschen und anschließend weitere 2o Minuten getrocknet.

Die einzelnen Filter wurden mit einer Pinzette dem Streifen entnommen und in Mini-Zählfläschchen aus Kunststoff (Zinsser, Frankfurt) gegeben. Danach kamen 1,5 ml Quickszint 5o1-Szin-

tillationsflüssigkeit (Zinsser, Frankfurt) pro Mini-Fläschchen dazu.
Nach Kühlung der Fläschchen im Szintillationsgerät für 3o Minuten wurde die Thymidin-Einbaurate in "counts per minute" (cpm) jeweils über eine Dauer von 2 Minuten im Flüssigszintillationszähler (Isocap Nuclear, Chicago) gezählt.

1. 6. 2. Separierte T-Zellfraktion

Die nach der unter Punkt 1.4.6. beschriebenen Methode abgetrennten T-Lymphozyten wurden ebenfalls auf eine Zellzahl von 2 x $1o^6$/ml eingestellt und analog der unter 1.6.1. beschriebenen Lymphozytengesamtfraktion im Lymphozvtentransformationstest eingesetzt.

1. 6. 3. Separierte B-Zellfraktion

Auch die im Panning-Verfahren separierten B-Lymphozyten wurden auf 2 x $1o^6$ Zellen/ml eingestellt und wie Lymphozytengesamtfraktion und T-Zellen im Lymphozytentransformationstest verwendet.

1. 6. 4. Auswertung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung der vom Flüssigszintillationszähler festgestellten und ausgedruckten Ergebnisse erfolgte nach folgenden Formeln:

Mittelwert "counts per minute" : $\bar{x} = \frac{\Sigma x}{n}$

Standardabweichung : $s = \sqrt{\frac{\Sigma(x-\bar{x})^2}{n-1}}$

Standardfehler : $s_e = \frac{s}{\sqrt{n}}$

Stimulationsindex $s_i = \frac{\bar{x} \text{ Proben}}{\bar{x} \text{ Kontrollen}}$

n = Anzahl der Proben = 3

x = Zahl der"counts"

1. 7. Durchführung der Intrakutantests

Die Versuchspferde wurden am Hals sorgfältig rasiert, desinfiziert und erhielten die zu testende Substanz in den jeweiligen Verdünnungen (Dosis o,2 ml) mit der Tuberkulinspritze intrakutan verabfolgt.

Die Ermittlung der Hautreaktion erfolgte in festgesetzten Zeitabständen post applicationem durch Messung der Hautfaltendicke in mm mittels eines Cutimeters direkt über der gekennzeichneten Injektionsstelle.

Positiv wurden Hautreaktionen bewertet, bei denen eine Hautdickenzunahme um 1oo Prozent gegenüber der Ausgangsmessung festzustellen war und die durch eine örtliche, infiltrative Umfangsvermehrung gekennzeichnet waren.

Weitergehende Bewertungskriterien waren Veränderungen an der Injektionsstelle, die im Sinne einer Entzündung der Haut charakterisiert waren durch Rötung, erhöhte Temperatur und Schmerzhaftigkeit.

1. 7. 1. Intrakutantest mit Phytohaemagglutinin

Phytohaemagglutinin (PHA; Wellcome, Beckenham), ein Glykoprotein aus Phaseolus vulgaris, wurde den Herstellerangaben entsprechend aufgelöst und mit PBS auf 3 Konzentrationen (o,1; o,o1 und o,oo1 mg/o,2 ml) eingestellt.
Diese Verdünnungen wurden nach der vorstehend beschriebenen Methode an 2 erwachsene Pferde und 2 Saugfohlen intrakutan verabreicht.
Eines der erwachsenen Pferde (Nr. 4) war vor Beginn des zweiten Versuches mit PIND-AVI vorbehandelt worden.

1. 7. 2. Intrakutantest mit PIND-AVI

Eine Stute sowie ein Saugfohlen wurden mit PIND-AVI paramunisiert und erhielten danach den Inducer in den Verdünnungen 1:2, 1:4, 1:16, 1:64 und 1:256 bzw. 1:2, 1:1o und 1:2o intrakutan injiziert.
Ein weiteres paramunisiertes erwachsenes Pferd wurde mit einer 1:2 Mischung von PIND-AVI und vermehrungsfähigem Rhinopneumonitisvirus im In-

trakutantest belastet.
An 2 Saugfohlen sowie an die Mutter des vorbehandelten Fohlens wurde der Paramunitätsinducer nur intrakutan appliziert.
Als Kontrollantigen erhielten alle 6 Pferde zellfreien FHE-Zellüberstand sowie Zellmedium (Earle-MEM) unverdünnt und in einer Verdünnung von 1:2 intrakutan verabreicht.

1. 7. 3. Intrakutantest mit Rhinopneumonitisvirus

a) Vermehrungsfähiges Rhinopneumonitisvirus

An 2 Pferde wurde intrakutan vermehrungsfähiges, zellfreies Rhinopneumonitisvirus, Stamm RAC-H, 26o. ENS-, 3. RK_{13}-Passage mit einem Infektiositätstiter von $1o^{5,5}$ KID_{5o}/o,o25 ml unverdünnt und in Verdünnungen von 1:4 und 1:16 verabreicht. Darüberhinaus erhielten diese Pferde lokal getrennt den zellfreien Überstand von RK_{13}-Zellen (96. Passage) sowie Viruserhaltungsmedium (TC 199) unverdünnt intrakutan appliziert.

Ein weiteres erwachsenes Pferd wurde in der beschriebenen Form paramunisiert und erhielt danach Virus und Kontrollflüssigkeiten wie die beiden nicht vorbehandelten Pferde intrakutan verabfolgt. Zusätzlich wurde diesem Pferd noch ein Gemisch aus vermehrungsfähigem Rhinopneumonitisvirus und PIND-AVI im Verhältnis 1:2 (unverdünnte Ausgangssubstanzen) intrakutan appliziert (siehe auch bei PIND-AVI).

b) Inaktiviertes Rhinopneumonitisvirus

Inaktiviertes (o,o3 % AEI über 16 Stunden bei + 37° C) Rhinopneumonitisvirus, Stamm RAC-H mit gleichem Ausgangstiter wurde unverdünnt intrakutan an 3 Saugfohlen verabreicht, von denen eines (Nr.18) mit PIND-AVI vorbehandelt worden war.
Auch die Mutter dieses vorbehandelten Fohlens erhielt inaktiviertes EHV_1 intrakutan appliziert.
Allen 4 Pferden wurde zellfreier RK_{13}-Zellüberstand und Viruserhaltungsmedium zur Kontrolle intrakutan injiziert.

2. Ergebnisse

2.1. Serologie

Von den in den Test eingesetzten Pferden waren jeweils vor Beginn jeder Untersuchung sowie darüberhinaus in dreimonatigen Intervallen Serumproben genommen und im Virusneutralisationstest auf Antikörper gegenüber equinem Herpesvirus, Serotyp 1, untersucht worden, um abzuklären, ob die Versuchspferde einer Neuinfektion ausgesetzt waren. Bei den paramunisierten Pferden war geprüft worden, ob die PIND-AVI-Applikation zur Bildung humoraler Antikörper geführt hatte.
Eine Übersicht über den EHV_1-Antikörperstatus der Pferde zu verschiedenen Zeitpunkten sowie Alter und Geschlecht der Pferde geben die Tabellen 7 a und b. Aktuelle Titer zum Zeitpunkt der jeweiligen Untersuchung sind in den entsprechenden Tabellen aufgeführt. Die signifikanten Antikörperanstiege der Pferde Nr. 1, 2 und 6 sind durch Vaccination bedingt.
Es gelang in keinem Fall humorale virusneutralisierende Antikörper gegenüber dem Avipox-Virus nachzuweisen. Die Titer aller untersuchten Pferde lagen bei $< 1:8$.

Pferd Nr.	Alter	Geschlecht	Titer virusneutralisierender Antikörper gegenüber EHV_1 in dreimonatigen Intervallen				
			o	3	6	9	12 Monate
1	3 Jahre	♀	1:8	1:96	1:48	1:32	1:12
2	2 Jahre	♀	1:24	1:256	1:128	1:64	1:24
3	9 Jahre	♂	1:112	1:112	1:64	1:12	1:8
4	5 Jahre	♀	1:128	1:112			
5	3 Jahre	♀	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8
6	1o Jahre	♂	1:96	1:96	1:64	1:32	1:128
7	12 Jahre	♂	1:24	1:48	1:96	1:64	1:48

Tabelle 7 a : Antikörpertiter gegenüber EHV_1 über den Zeitraum eines Jahres sowie Alter und Geschlecht der Versuchspferde Nr. 1 - 7.

Pferd Nr.	Alter	Geschlecht	Titer virusneutralisierender Antikörper gegenüber EHV_1
8	16 Jahre	♀	< 1:8
9	12 Jahre	♀	1:1o
1o	6 Jahre	♂	1:48
11	2o Jahre	♀	1:96
12	6 Jahre	♂	1:128
13	5 Jahre	♂	1:56
14	7 Jahre	♀	1:14
15	11 Jahre	♂	1:14
16	2 Tage	♀	1:8
17	13 Jahre	♀	1:2o
18	12 Tage	♀	1:2o
19	1o Tage	♂	1:24
2o	4 Tage	♀	1:14

Tabelle 7 b : Antikörpertiter gegenüber EHV_1 sowie Alter und Geschlecht der Versuchspferde Nr. 8 - 2o.

2. 2. Differenzierung der T- und B-Lymphozyten im E-Rosettentest

Eine Differenzierung von Lymphozyten ist möglich durch den E-Rosettentest (5o, 112, 116, 184, 2o1), bei dem der prozentuale Anteil derjenigen T-Zellen, die mit Erythrozyten anderer Spezies Rosetten bilden, ermittelt wird.

Die Ergebnisse, die wir nach Untersuchungen an 6 Pferden unterschiedlichen Alters in diesem Test erhielten, sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Die Pferde Nr. 1 und 2 waren über einen Zeitraum von 6 Wochen in wöchentlichen Abständen, die Pferde Nr. 3 bis 5 und 16 jeweils drei- bzw. zweimal im Abstand von einer Woche untersucht worden.

Pferd Nr. 2 war nach dem ersten Test in der beschriebenen Form mit PIND-AVI paramunisiert worden.

Die Prozentsätze der Rosetten, die die peripheren T-Lymphozyten des Pferdes Nr. 1 mit Meerschweinchenerythrozyten bildeten, schwankten im Zeitraum von eineinhalb Monaten zwischen 14 und 2o,5 Prozent.

Pferd Nr. 2 wies im ersten Test 15,5 Prozent E-

Rosetten auf, die danach erfolgte Paramunisierung hatte offensichtlich eine Erhöhung auf 29 Prozent zur Folge. Dieser Prozentsatz fiel in den darauffolgenden 3 Wochen kontinuierlich auf 17,5 Prozent Meerschweinchenerythrozyten-Rosetten-bildender T-Lymphozyten ab.

Bei den Pferden Nr. 3 und 4 wurden Werte von 11, 14 und 17 sowie 1o,5 und 13,5 Prozent ermittelt. Diese Ergebnisse entsprechen insgesamt denen anderer Autoren (5o, 112, 116, 184).

Demgegenüber wies Pferd Nr. 5 (3 Jahre) sowie das 2 Tage alte Saugfohlen lediglich 5, 7 und 4 bzw. 6, 6 und 5 Prozent Meerschweinchenerythrozyten-Rosetten-formende T-Zellen auf. Die deutlich reduzierten Prozentsätze dieser Pferde werten wir als Ausdruck eines Mangels zirkulierender, reaktionsfähiger T-Lymphozyten.

Pferd Nr.	Alter	Versuch Nr. 1	2	3	4	5	6
1	3 Jahre	2o,5	19,5	19	17,5	14	16
2	2 Jahre	15,5	29 +	23	21	18,5	17,5
3	9 Jahre	n.u.	n.u.	n.u.	14	17	11
4	5 Jahre	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	13,5	1o,5
5	3 Jahre	n.u.	n.u.	n.u.	5	7	4
16	2 Tage	6	6	5	n.u.	n.u.	n.u.

Tabelle 8 : Prozentsätze Meerschweinchenerythrozyten-Rosetten-bildender T-Lymphozyten von 6 verschiedenen Pferden unterschiedlichen Alters, untersucht in wöchentlichen Abständen.

+ = nach vorhergegangener Paramunisierung mit PIND-AVI

n.u. = nicht untersucht.

2. 3. Lymphozytentransformationstests

Pferdelymphozyten, die aus dem strömenden Blut isoliert worden waren, ließen sich im Mikro-Lymphozytentransformationstest sowohl mit dem eingesetzten Mitogen PHA-P als auch mit Paramunitätsinducern und Virusantigen (EHV_1) transformieren. Die Reaktivität der Pferdelymphozyten im Vergleich zu der anderer Spezies erwies sich auch in diesen Untersuchungen als quantitativ schwächer. Zur Feststellung der Transformation der Lymphozyten wurde die Einbaurate von ^{14}C-Thymidin gemessen und in Form des Stimulationsindexes (s_i) angegeben.

Analog zu anderen Untersuchungen am Pferd (39, 42, 117, 208) wurden nur Stimulationsindizes $>$ 2,0 als spezifische Reaktion gewertet.

Die Pferde Nr. 1 und 2 wurden über einen Zeitraum von eineinhalb Jahren regelmäßig untersucht, die Pferde Nr. 3 bis 15 waren nur in einige Versuchsabschnitte einbezogen worden.

2. 3. 1. Lymphozytentransformationstest mit Phytohaemagglutinin-P

a) Lymphozytengesamtfraktion

Alle Versuche zur Lymphozytentransformation wurden mit polysaccharidfreiem Phytohaemagglutinin (PHA-P) durchgeführt.
Generell gelang es mit diesem Lektin, die peripheren Lymphozyten der untersuchten Pferde zu transformieren.
In Vorversuchen an 2 Pferden wurde PHA-P in Verdünnungen von 1:1o bis 1:1o ooo getestet. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 9 aufgeführt.
Die Lymphozyten der beiden Pferde reagierten sehr unterschiedlich auf gleiche Arbeitsverdünnungen von PHA-P. Im Ganzen ließ sich jedoch eine Korrelation zwischen eingesetzter PHA-P-Konzentration und erzieltem Stimulationsindex dahingehend erkennen, daß mit fallenden Lektin-Konzentrationen steigende Transformationsergebnisse festzustellen waren, die erst bei sehr hoher PHA-P-Verdünnung (1:1o ooo) wieder abfielen.

Pferd Nr.	PHA-P-Verdünnungen +								
	1:1o	1:5o	1:1oo	1:2oo	1:5oo	1:1ooo	1:2ooo	1:5ooo	1:1oooo
1	o,54	1o,78	47,o6	68,73	93,65	91,o5	99,73	1oo,73	85,26
2	o,62	o,76	2,o5	1,91	92,85	42,35	34,23	43,5o	32,86

Tabelle 9 : Übersicht über die in Vorversuchen im Lymphozytentransformationstest eingesetzten PHA-P - Verdünnungen und die hiermit erhaltenen Stimulationsindizes (S_i).
+ = vom Hersteller wurde keine Mengenangabe über die Ausgangskonzentration der Substanz gemacht.

Aufgrund dieser in Tabelle 9 dargestellten Ergebnisse der Vorversuche verwendeten wir in den Hauptversuchen - unter Berücksichtigung der offensichtlich vorliegenden individuellen Reaktionslage der Lymphozyten verschiedener Pferde - PHA-P in den Verdünnungen von 1:1oo, 1:5oo und 1:1ooo.

Die in den Hauptversuchen an 15 verschiedenen Pferden unterschiedlichen Alters mit PHA-P erzielten Stimulationsindizes sind in Tabelle 1o aufgeführt.
Die peripheren Lymphozyten aller untersuchten Pferde ließen sich mit den eingesetzten PHA-P-Verdünnungen graduell unterschiedlich in Abhängigkeit vom Versuchsansatz transformieren. Die in den verschiedenen Tests stark variierenden Werte der Pferde Nr. 1, 2 und 4 bis 7 lassen auf eine unterschiedliche Reaktionsfähigkeit ihrer Lymphozyten schließen.
Um diese unterschiedliche Reaktivität der peripheren Lymphozyten zu objektivieren, untersuchten wir daraufhin die Pferde Nr. 1 und 2 in achtwöchigen Abständen über den Zeitraum eines Jahres.

Pferd Nr.	Versuchs-ansatz	PHA-P-Verdünnungen 1:1oo	1:5oo	1:1ooo
1	1	3o,21	1o1,81	1o9,31
1	2	44,12	68,13	86,12
1	3	14,o8	28,61	35,52
1	4	5,44	13,21	12,61
1	5	o,88	1,14	o,83
2	1	6,31	33,67	98,21
2	2	1o,34	17,51	23,21
2	3	14,28	24,61	29,86
2	4	2,61	16,75	24,21
2	5	1,82	1,66	2,o4
3	7	1,84	4,31	6,28
4	8	115,78	171,99	82,51
4	9	1,99	11,38	15,32
5	1o	24,86	65,72	66,87
5	11	6,74	36,51	51,o6
6	8	53,85	8o,84	74,21
6	9	19,31	23,41	26,72
6	11	o,84	2,55	18,12
7	8	2,15	3,61	12,51
7	9	35,29	42,81	61,52
7	1o	21,21	22,59	24,31
8	12	6,72	11,o2	11,36
9	12	13,39	3o,55	34,83
1o	13	15,61	28,21	65,45
11	13	5,42	2o,63	22,27
12	13	8,63	1o,18	18,3o
13	13	27,31	46,51	47,27
14	13	8,76	36,18	56,48
15	13	6,31	26,71	17,71

Tabelle 1o : Mit PHA-P erzielte Stimulationsindizes peripherer Lymphozyten von 15 verschiedenen Pferden (Gesamtlymphozytenfraktion).

Verlaufsuntersuchungen

Wie angeführt, hatte es sich im Hauptversuch gezeigt, daß die Lymphozytentransformationsraten durch PHA-P starken Schwankungen unterworfen waren. Um einen Überblick über die Transformationsfähigkeit der Lymphozyten eines Individuums über eine längere Zeitspanne zu erhalten, waren die Pferde Nr.1 und 2 über einen Zeitraum von einem Jahr in zweimonatigen Abständen untersucht worden. Die Resultate dieser Verlaufsuntersuchungen sind in Tabelle 11 aufgeführt.
Wie aus dieser Tabelle ersichtlich ist, kam es offenbar im gewählten Rhythmus der 8 Wochen zu Reduktion und Wiederanbildung reaktiver T-Zellen im peripheren Blut der untersuchten Pferde. Dies dokumentiert sich im Absinken und Ansteigen der Stimulationsindizes in etwa synchron zu diesem Zeitintervall.

Pferd Nr. 1	PHA-P - Verdünnungen 1:1oo	1:2oo	1:5oo	1:1ooo
Februar	6,56	17,59	27,86	45,59
April	41,68	67,32	54,51	68,31
Juni	32,53	1oo,92	142,42	121,47
August	3o,46	44,44	63,92	51,63
Oktober	5o,63	74,29	82,44	89,68
Dezember	13,o6	12,16	27,47	34,54

Pferd Nr. 2	PHA-P - Verdünnungen 1:1oo	1:2oo	1:5oo	1:1ooo
Februar	3,52	8,43	26,66	37,47
April	18,31	36,51	73,51	59,26
Juni	4,38	31,82	95,o7	72,31
August	52,25	8o,82	68,19	42,56
Oktober	34,19	39,18	43,56	28,93
Dezember	11,38	18,34	21,73	26,83

Tabelle 11 : Mit verschiedenen Verdünnungen von PHA-P erzielte Stimulationsindizes von Lymphozyten der Pferde Nr. 1 und 2 über den Zeitraum eines Jahres (zweimonatige Intervalle, Gesamtlymphozytenfraktion).

b) T- und B-Lymphozyten

Die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen separierter T- und B-Lymphozyten sowie der Gesamtlymphozytenfraktion im Lymphozytentransformationstest gegenüber PHA-P sind in Tabelle 12 aufgeführt.
Es zeigte sich, daß generell vergleichbare Stimulationsindizes der untersuchten 2 Pferde bei Verwendung der T-Zell- und der Gesamtfraktion zu erhalten waren, während die B-Zellfraktion in der Regel unter der geforderten Grenze blieb. Lediglich einmal (Pferd Nr. 2, Versuch 1) war eine Transformation auch mit B-Lymphozyten zu verzeichnen.

Pferd Nr. 1		PHA-P-Verdünnung 1:1oo	1:5oo	1:1ooo
Versuch I	Gesamtfraktion	o,88	1,14	o,83
	T-Zellen	2,o2	3,6o	3,21
	B-Zellen	1,o9	1,83	1,63
Versuch II	Gesamtfraktion	13,o6	27,47	34,54
	T-Zellen	17,19	35,64	57,24
	B-Zellen	n.u.	n.u.	n.u.
Pferd Nr. 2		PHA-P-Verdünnung 1:1oo	1:5oo	1:1ooo
Versuch I	Gesamtfraktion	1,8o	1,66	2,o4
	T-Zellen	3,12	4,15	6,71
	B-Zellen	1,91	1,89	2,31
Versuch II	Gesamtfraktion	11,38	21,73	26,83
	T-Zellen	4,17	1o,27	12,81
	B-Zellen	n.u.	n.u.	n.u.

Tabelle 12 : Stimulationsindizes separierter T- und B-Lymphozyten der Pferde Nr. 1 und 2 gegenüber PHA-P im Vergleich zu deren Gesamtlymphozytenfraktion.
n.u. = nicht untersucht.

2. 3. 2. Lymphozytentransformationstest mit PIND-AVI

2. 3. 2. 1. Nicht paramunisierte Pferde

a) Lymphozytengesamtfraktion

Auch mit PIND-AVI war es möglich, im Lymphozytentransformationstest Stimulationsindizes > 2 zu erzielen.
In Pilotversuchen hatten wir die Inducerkonzentrationen ermittelt, mit denen dann die Hauptversuche durchgeführt wurden. Die in diesen Vorversuchen ermittelten Ergebnisse gibt Tabelle 13 wieder.
Der als Kontrolle in allen Versuchen eingesetzte zellfreie Überstand von FHE-Zellen war nicht in der Lage, Lymphozyten zu transformieren, ebensowenig des Viruserhaltungsmedium.

Pferd Nr.	PIND-AVI-VERDÜNNUNGEN								FHE-Zellüberstand		
	1:2	1:1o	1:5o	1:1oo	1:2oo	1:5oo	1:1ooo	1:2ooo	uvd.	1:1o	1:1oo
1	o,19	o,32	o,73	1,4o	2,o6	2,2o	1,37	o,94	o,42	o,34	o,21
2	o,47	o,65	o,75	4,o8	4,46	1,64	1,16	o,59	o,61	o,38	o,18

Tabelle 13 : Übersicht über die in den Vorversuchen im Lymphozyten-transformationstest eingesetzten PIND-AVI - Verdünnungen und die damit erzielten Stimulationsindizes.
Kontrollen: FHE - Zellüberstand.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde in den Hauptversuchen PIND-AVI in den Verdünnungen 1:5o, 1:1oo, 1:5oo und 1:1ooo eingesetzt.

Als optimale Arbeitsdosis erwies sich die PIND-AVI-Verdünnung von 1:5oo. Der höchste Stimulationsindex, der damit im Test erzielt werden konnte, betrug 1o,92 (Pferd Nr. 2, Test 6, Tabelle 14).

Die Resultate dieser Untersuchungen an 15 Pferden sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Auch hier ergab sich, analog den schon bei den Versuchen mit PHA-P geschilderten Beobachtungen, daß eine Varianz der Ergebnisse hinsichtlich der individuellen Reaktionsfähigkeit einzelner Pferde als auch der verschiedenen Entnahmen zu verzeichnen war.

Die Kombination von PIND-AVI mit PHA-P hatte keine Erhöhung der Stimulationsindizes gegenüber denjenigen mit den Substanzen allein erreichten in der entsprechenden Verdünnung zur Folge.

Pferd Nr.	Versuchs-ansatz	PIND-AVI - Verdünnungen 1:5o	1:1oo	1:5oo	1:1ooo
1	1	o,92	3,98	4,43	o,73
1	2	1,4o	2,o6	2,2o	1,94
1	3	o,98	1,16	1,45	o,92
1	4	o,52	3,33	2,46	o,77
1	5	2,21	2,61	1,89	o,35
2	1	4,o8	4,46	1,65	1,57
2	2	1,56	4,51	2,96	1,46
2	3	3,85	2,32	5,86	7,37
2	4	o,97	o,92	o,59	1,25
2	5	3,52	5,61	o,73	o,85
2	6	4,28	6,65	1o,92	o,47
3	7	2,12	1,48	3,57	o,54
4	8	1,43	2,58	4,21	2,16
4	9	o,58	1,58	3,56	1,69
5	1o	1,58	3,93	2,44	2,21
5	11	2,37	4,69	3,47	1,88
6	8	o,54	1,56	2,5o	1,75
6	9	1,59	1,32	2,88	o,68
6	11	o,97	2,58	2,46	o,21
7	8	1,57	2,79	3,58	1,66
7	9	2,o6	3,o6	3,55	1,23
7	1o	o,64	2,88	2,94	2,54
8	12	o,56	2,34	o,49	o,31
9	12	o,59	1,12	1,37	o,81
1o	13	1,78	2,55	o,97	1,24
11	13	1,2o	1,15	1,1o	o,78
12	13	o,76	o,45	o,57	o,89
13	13	o,76	o,88	1,61	1,46
14	13	1,68	2,41	1,89	1,84
15	13	o,78	o,41	o,53	o,66

Tabelle 14 : Mit dem Paramunitätsinducer PIND-AVI erzielte Stimulationsindizes peripherer Lymphozyten von 15 verschiedenen Pferden (Gesamtlymphozytenfraktion).

b) Separierte T-Lymphozyten

Die Verwendung separierter T-Lymphozyten der Pferde Nr. 4 und 5 im Lymphozytentransformationstest mit PIND-AVI erbrachte in allen Verdünnungsstufen Stimulationsindizes > 2.
Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Pfd. Nr.		PIND-AVI-Verdünnungen			
		1:5o	1:1oo	1:5oo	1:1ooo
4	Gesamtfr.	1,43	2,58	4,21	2,16
	T-Zellen	3,23	8,63	5,58	3,61
5	Gesamtfr.	1,58	3,93	2,44	2,21
	T-Zellen	2,89	6,53	4,6o	3,28

Tabelle 15: Mit PIND-AVI erzielte Stimulationsindizes separierter T-Lymphozyten der Pferde Nr. 4 und 5 im Vergleich zur Lymphozytengesamtfraktion.

Es war festzustellen, daß die Verwendung separierter T-Zellen durchschnittlich höhere Stimulationsindizes als nach Verwendung der Gesamtlymphozytenfraktion der gleichen Pferde zur Folge hatte.

2. 3. 2. 2. Paramunisierte Pferde

a) Lymphozytengesamtfraktion

An 2 paramunisierten Pferden wurden periphere Lymphozyten (Gesamtfraktion) 24 Stunden nach Abschluß der Paramunisierung im Lymphozytentransformationstest untersucht.
Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Pferd Nr.	PIND-AVI-Verdünnung 1:5o	1:1oo	1:5oo	1:1ooo
1	4,96	14,43	7,48	6,29
2	4,28	12,69	6,65	5,52

Tabelle 16 : Mit PIND-AVI erzielte Stimulationsindizes der Pferde Nr. 1 und 2 nach vorheriger Paramunisierung (Lymphozytengesamtfraktion).

Die Befunde sprechen dafür, daß die Paramunisierung zu einer Aktivierung reaktiver T-Zellen geführt hatte, was sich in einer signifikanten Erhöhung der Stimulationsindizes der beiden untersuchten

Pferde Nr. 1 und 2 auf 14,43 bzw. 12,69 ausdrückte. Beide Werte wurden bei einer PIND-AVI-Gebrauchsverdünnung von 1:1oo registriert, mit der bei den nicht paramunisierten Pferden lediglich Stimulationsindizes von maximal 3,98 resp. 6,65 (siehe Tabelle 14) zu erzielen gewesen waren.

b) Separierte T-Lymphozyten

Die Inkubation separierter T-Lymphozyten der paramunisierten Pferde Nr. 1 und 2 mit PIND-AVI erbrachte in allen Verdünnungen deutlich erhöhte Stimulationsindizes. Der höchste Wert wurde bei Pferd Nr. 1 mit 17,23, wiederum durch die PIND-AVI-Gebrauchsverdünnung von 1:1oo erzielt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Pferd Nr.	PIND-AVI-Verdünnung 1:5o	1:1oo	1:5oo	1:1ooo
1	6,77	17,23	9,86	7,57
2	5,86	14,24	8,34	6,57

Tabelle 17 : Mit PIND-AVI erzielte Stimulationsindizes separierter T-Zellen der Pferde Nr. 1 und 2 nach Paramunisierung

Diese Ergebnisse zeigen, daß insgesamt höhere Stimulationsindizes bei Verwendung separierter T-Zellen gegenüber der Lymphozytengesamtfraktion zu verzeichnen waren. Hinsichtlich der Dosis-Wirkungs-Beziehung von PIND-AVI bestand in beiden Tests Übereinstimmung.

2. 3. 3. Lymphozytentransformationstest mit PIND-ORF

Der unter Verwendung des Virus der Pustulardermatitis der Schafe hergestellte Paramunitätsinducer PIND-ORF hatte sich in vorausgegangenen experimentellen Untersuchungen in verschiedenen Testsystemen ebenfalls als wirksam erwiesen (11o).
Dieser Inducer wurde von uns aufgrund der beschriebenen Erfahrungen mit PIND-AVI im Lymphozytentransformationstest in den Gebrauchsverdünnungen von 1:5o, 1:1oo, 1:5oo und 1:1ooo eingesetzt.
Auch mit PIND-ORF konnten wir Lymphozyten der Pferde Nr. 1 und 2 (nicht paramunisiert), die in diesen Versuch einbezogen worden waren, transformieren.
Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 18 aufgeführt.
Aus dieser Tabelle ist vor allem zu erkennen, daß die optimal wirksame Gebrauchsverdünnung von PIND-ORF bei 1:5o lag. Der damit erzielte höchste Stimulationsindex betrug 13,73.
Die Stimulationsindizes, die durch die höheren Gebrauchsverdünnungen erhalten wurden, fielen dann linear ab.

Pferd Nr.	Versuch	PIND-ORF - Verdünnungen 1:5o	1:1oo	1:5oo	1:1ooo
1	1	13,73	2,36	1,62	1,99
1	2	4,64	1,55	2,26	1,52
2	1	9,68	3,o8	3,31	1,84
2	2	o,75	o,78	o,82	o,96

Tabelle 18 : Stimulationsindizes von Gesamtlymphozyten der Pferde Nr. 1 und 2 durch den Paramunitätsinducer PIND-ORF.

Die Verwendung separierter T- und B-Zellen im Lymphozytentransformationstest erbrachte die in Tabelle 19 aufgeführten Resultate.
Wie diese Ergebnisse zeigen, wurde durch PIND-ORF überraschenderweise sowohl die Lymphozytengesamtfraktion als auch -quantitativ geringer - die B-Lymphozytenfraktion (Pferd Nr. 2) transformiert. Die T-Zellreaktion beider untersuchter Pferde blieb unter einem Stimulationsindex von 2. Hinsichtlich der B-Zellreaktion des Pferdes Nr. 2 bestand eine lineare Beziehung zwischen eingesetzter PIND-ORF-Verdünnung und Transformationsrate. Diese Beobachtung trifft in etwa auch auf die Reaktion der Gesamtlymphozytenfraktion beider untersuchter Pferde zu.

	PIND-ORF - Verdünnungen			
	1:5o	1:1oo	1:5oo	1:1ooo
Pferd Nr. 1				
Gesamtfraktion	13,73	2,36	1,62	1,99
T-Zellen	1,54	1,63	1,72	1,72
B-Zellen	2,o9	1,77	2,43	o,81
Pferd Nr. 2				
Gesamtfraktion	9,68	3,o8	3,31	1,84
T-Zellen	1,61	1,23	1,54	1,87
B-Zellen	6,oo	2,9o	1,76	1,63

Tabelle 19 : Stimulationsindizes separierter T- und B-Zellen der Pferde Nr. 1 und 2 im Vergleich zur Gesamtlymphozytenfraktion nach Inkubation mit PIND-ORF.

2. 3. 4. Lymphozytentransformationstest mit Rhinopneumonitisvirus

Um einen direkten Vergleich zwischen antigenspezifischer und antigenunabhängiger Lymphozytenreaktion zu erhalten, wurden periphere Lymphozyten von 1o Pferden, die auch gegenüber PIND-AVI oder PIND-ORF untersucht worden waren, gegenüber vermehrungsfähigem und inaktiviertem EHV_1 im Lymphozytentransformationstest geprüft.
Die Pferde wiesen zum Zeitpunkt der Untersuchungen unterschiedliche Titer humoraler, virusneutralisierender EHV_1-Antikörper auf (siehe Tabellen 2o und 21). In allen Versuchen lief als Kontrollantigen zellfreier Überstand von RK_{13}-Zellen, auf denen das EHV_1 vermehrt worden war, parallel. Damit gelang es in keinem Falle, Lymphozyten zu transformieren.

2. 3. 4. 1. Lymphozytengesamtfraktion

a) Vermehrungsfähiges Rhinopneumonitisvirus

Generell war vermehrungsfähiges Rhinopneumonitisvirus in der Lage, Pferdelymphozyten zu transformieren. Der höchste Stimulationsindex, der erzielt werden konnte, betrug 12,06. Die Resultate sind im Einzelnen in Tabelle 2o aufgeführt.
Zwischen Serumtitern und Lymphozytentransformationsrate aller untersuchten Pferde konnte keine direkte Beziehung nachgewiesen werden. Auch seronegative Pferde oder Pferde mit geringen Titern humoraler Antikörper reagierten positiv im Lymphozytentransformationstest, wie umgekehrt auch Pferde mit hohen Serumtitern keine Transformation zeigten.

Zwischen der eingesetzten Virusgebrauchsdosis im Lymphozytentransformationstest und den Stimulationsindizes der untersuchten Pferde bestand keine Korrelation.

Pferd Nr.	Rhinopneumonitisvirus vermehrungsfähig uvd.	1:2	1:1o	1:1oo	EHV_1-Titer
1	4,73	3,42	1,55	o,81	1:8
2	3,o1	7,89	1o,85	2,o9	1:24
8	1,32	1,55	2,42	o,52	<1:8
9	3,99	2,49	3,65	4,53	1:1o
1o	2,o4	2,78	3,35	n.u.	1:48
11	o,99	2,29	1,82	n.u.	1:96
12	o,77	1,34	1,5o	n.u.	1:128
13	1,13	3,34	1,18	n.u.	1:56
14	6,67	5,88	12,o6	n.u.	1:14
15	o,43	2,o9	o,43	n.u.	1:14

Tabelle 2o : Stimulationsindizes von Gesamtlymphozyten 1o verschiedener Pferde gegenüber vermehrungsfähigem Rhinopneumonitisvirus. n.u. = nicht untersucht.

b) Inaktiviertes Rhinopneumonitisvirus

Im gleichen Testansatz wurden die Pferde, deren periphere Lymphozyten mit vermehrungsfähigem EHV_1 transformiert wurden, auch gegenüber chemisch inaktiviertem EHV_1 (o,o3 % AEI) untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 aufgezeigt.
Auch durch inaktiviertes Herpesvirus waren Pferdelymphozyten transformierbar, allerdings ergaben sich sowohl hinsichtlich der Lymphozytenreaktion einzelner Pferde als auch der verwendeten Virusverdünnung Unterschiede gegenüber dem Test mit vermehrungsfähigem Rhinopneumonitisvirus. Es konnte in diesen Untersuchungen lediglich bestätigt werden, daß die Pferde, die gegenüber vermehrungsfähigem EHV_1 mit den höchsten Stimulationsindizes reagierten (Pferde Nr. 1, 2, 14) auch gegenüber inaktiviertem EHV_1 die besten Transformationsraten zeigten, wobei Pferd Nr. 14 gegenüber inaktiviertem Virus signifikant höhere Stimulationsindizes aufwies als gegenüber vermehrungsfähigem Virus. Bezüglich der Dosis-Wirkungsbeziehung war auch hier der Trend erkennbar, daß die gewählten Virusverdünnungen von 1:1o und 1:1oo stärkere Transformation bewirkten als konzentrierteres Virus.

Pferd Nr.	Rhinopneumonitisvirus inaktiviert				EHV_1-Titer
	uvd.	1:2	1:1o	1:1oo	
1	4,15	3,61	4,78	1,82	1:8
2	8,o5	3,3o	4,25	17,18	1:24
1o	o,65	1,35	3,11	n.u.	1:48
11	o,98	1,33	1,65	n.u.	1:96
12	o,35	o,74	1,o9	n.u.	1:128
13	1,14	1,94	1,31	n.u.	1:56
14	1o,45	1o,14	2o,79	n.u.	1:14
15	o,99	o,27	o,35	n.u.	1:14

Tabelle 21 : Stimulationsindizes von Gesamtlymphozyten 8 verschiedener Pferde gegenüber AEI-inaktiviertem Rhinopneumonitisvirus. n.u. = nicht untersucht.

2. 3. 4. 2. Separierte T- und B-Lymphozyten

Separierte T- und B-Lymphozyten (Pferde Nr. 1 und 2) ließen sich durch vermehrungsfähiges und inaktiviertes Rhinopneumonitisvirus transformieren. Diese Untersuchungen wurden im gleichen Testansatz wie unter 2.3.4.1. beschrieben, durchgeführt. Wie die Ergebnisse in Tabelle 22 zeigen, reagierte die T-Zellfraktion des Pferdes Nr. 1 sowohl gegenüber vermehrungsfähigem als auch inaktiviertem EHV_1 stärker als die Gesamtlymphozytenfraktion. Die Reaktion des Pferdes Nr. 2 verlief umgekehrt. Mit der B-Zellfraktion ließen sich Stimulationsindizes bis 3,72 erzielen.

	Rhinopneumonitisvirus vermehrungsfähig				Rhinopneumonitisvirus inaktiviert				EHV_1-Titer
	uvd.	1:2	1:1o	1:1oo	uvd.	1:2	1:1o	1:1oo	
Pferd Nr. 1									
Gesamtfraktion	4,73	3,42	1,55	o,81	4,15	3,61	4,78	1,82	
T-Zellen	9,64	11,22	4,o5	1,13	6,27	2,78	n.u.	n.u.	1:8
B-Zellen	nicht untersucht				3,19	1,35	2,21	2,o2	
Pferd Nr. 2									
Gesamtfraktion	3,o1	7,89	1o,85	2,o9	8,o5	3,3o	4,25	17,18	
T-Zellen	2,43	1,58	1,o5	o,35	1,21	1,o7	1,25	2,25	1:24
B-Zellen	nicht untersucht				3,72	1,13	1,o5	o,71	

Tabelle 22 : Stimulationsindizes separierter T- und B-Lymphozyten der Pferde Nr. 1 und 2 gegenüber vermehrungsfähigem und inaktiviertem Rhinopneumonitisvirus im Vergleich zu deren Gesamtlymphozytenfraktion.

2. 4. Intrakutantests

2. 4. 1. Intrakutantest mit Phytohaemagglutinin

Phytohaemagglutinin (PHA; Wellcome, Beckenham) war in Konzentrationen von o,1, o,o1 und o,oo1 mg/o,2 ml in einem Abstand von 1o cm intrakutan am Halse der Pferde appliziert worden.

Bei den untersuchten Tieren (2 erwachsene Pferde,- Nr. 3 und 4; 2 Fohlen, Nr. 19 und 2o) waren positive Hautreaktionen gegenüber PHA zu verzeichnen, die ihren Höhepunkt bei den erwachsenen Pferden im Durchschnitt zur 12. bis 24. Stunde post injectionem hatten. Die Saugfohlen (Pferde Nr. 19, 2o; Tabelle 24) dagegen zeigten ihr Reaktionsoptimum zwischen 6. und 12. Stunde post injectionem.

Die Stärke der Hautdickenzunahme war von der verwendeten PHA-Konzentration direkt abhängig (siehe Tabelle 23 und 24, Abbildung 1).

Pferd Nr. 4 reagierte nach vorangegangener Paramunisierung mit PIND-AVI im Hauttest früher und deutlich stärker gegenüber PHA als es vor der Paramunisierung reagiert hatte (Tabelle 23 und Abbildung 2).

Die Einzelergebnisse der Intrakutantests mit Phytohaemagglutinin sind in den Tabellen 23 und 24 sowie den Abbildungen 1 bis 3 aufgezeigt.

	Pferd Nr. 3			Pferd Nr. 4					
				vor Paramunisierung			nach Paramunisierung mit PIND-AVI		
	PHA in mg/o,2 ml			PHA in mg/o,2 ml			PHA in mg/o,2 ml		
	o,1	o,o1	o,oo1	o,1	o,o1	o,oo1	o,1	o,o1	o,oo1
Hautdicke in mm vor Test	3,8	3,8	3,8	2,7	2,7	2,7	3,6	3,6	3,6
nach 1 h	3,8	3,8	3,8	2,7	2,7	2,7	5,6	5,4	4,5
nach 3 h	8,9	6,9	6,8	7,2	4,6	4,3	11,o	1o,1	5,3
nach 6 h	9,o	7,2	6,9	7,3	5,2	4,4	12,9	1o,1	5,6
nach 12 h	9,8	7,4	7,o	7,5	5,4	4,6	9,3	7,6	5,5
nach 24 h	1o,5	7,5	6,5	7,5	5,2	4,1	9,2	6,2	5,1
nach 48 h	1o,5	7,3	6,5	5,1	4,o	3,5	9,o	6,2	5,o
nach 72 h	8,4	7,o	5,8	4,5	3,5	3,o	6,5	5,6	4,6
nach 96 h	6,8	5,5	5,o	3,4	3,1	2,7	5,5	5,o	4,2
nach 12o h	6,5	4,8	4,4	3,o	2,7	-	4,8	4,4	4,o

Tabelle 23 : Verlauf der Hautreaktion nach intrakutaner Applikation von PHA, Pferde Nr. 3 und 4, Pferd Nr. 4 vor und nach erfolgter Paramunisierung mit PIND-AVI.

	Pferd Nr. 19		Pferd Nr. 2o	
	PHA in mg/o,2 ml		PHA in mg/o,2 ml	
	o,1	o,o1	o,1	o,o1
Hautdicke in mm vor Test	2,o	2,o	1,5	1,5
nach 1 h	2,3	2,o	1,5	1,5
nach 3 h	6,9	5,6	6,o	5,o
nach 6 h	13,4	6,o	7,o	5,5
nach 12 h	12,5	5,2	6,3	4,6
nach 24 h	4,8	3,o	4,5	2,3
nach 48 h	3,9	2,1	3,4	1,7
nach 72 h	2,4	2,o	1,8	1,5

Tabelle 24 : Verlauf der Hautreaktion nach intrakutaner Applikation von PHA, Pferde Nr. 19 und 2o (Saugfohlen, 1o und 4 Tage alt).

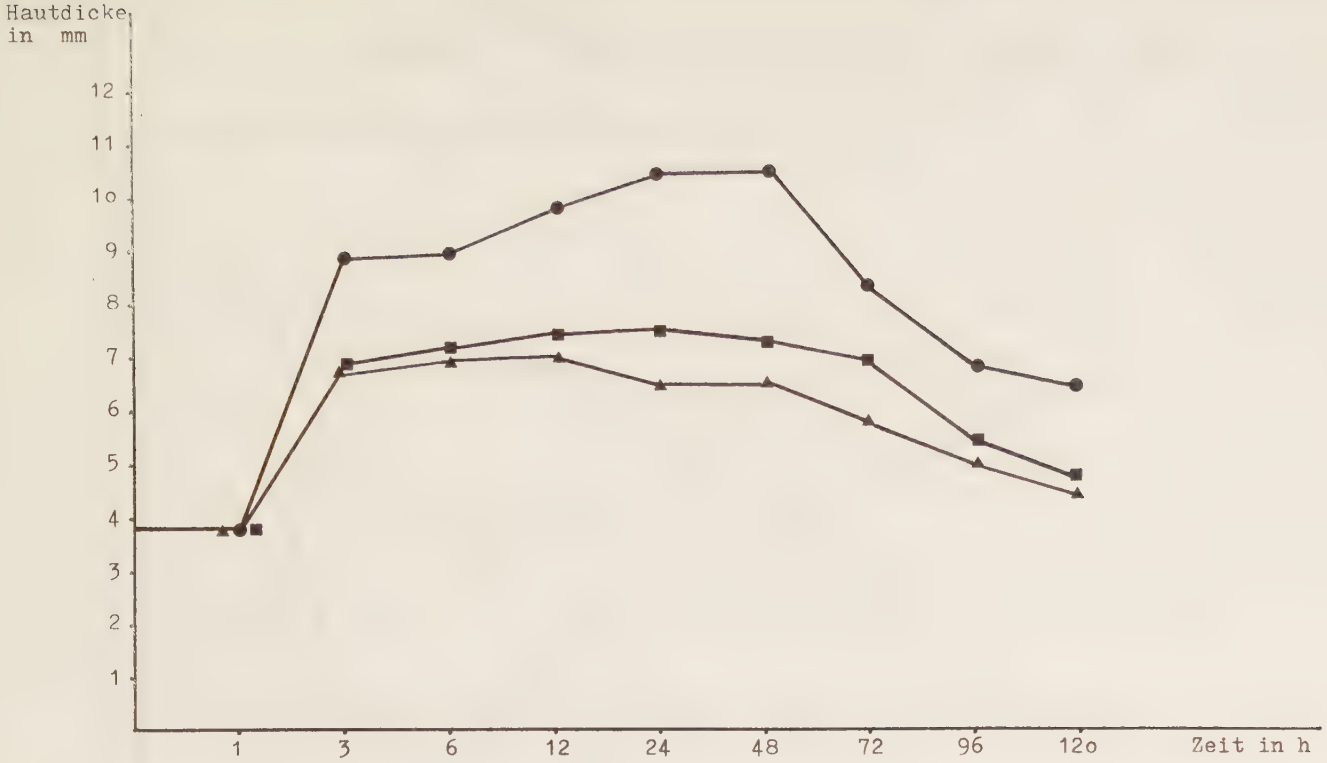

Abbildung 1 : Verlauf der Hautreaktion nach intrakutaner Applikation von PHA (o,1 ● , o,o1 ■ und o,oo1 ▲ mg/o,2 ml), Pferd Nr. 3, Dosis-Wirkungskurve.

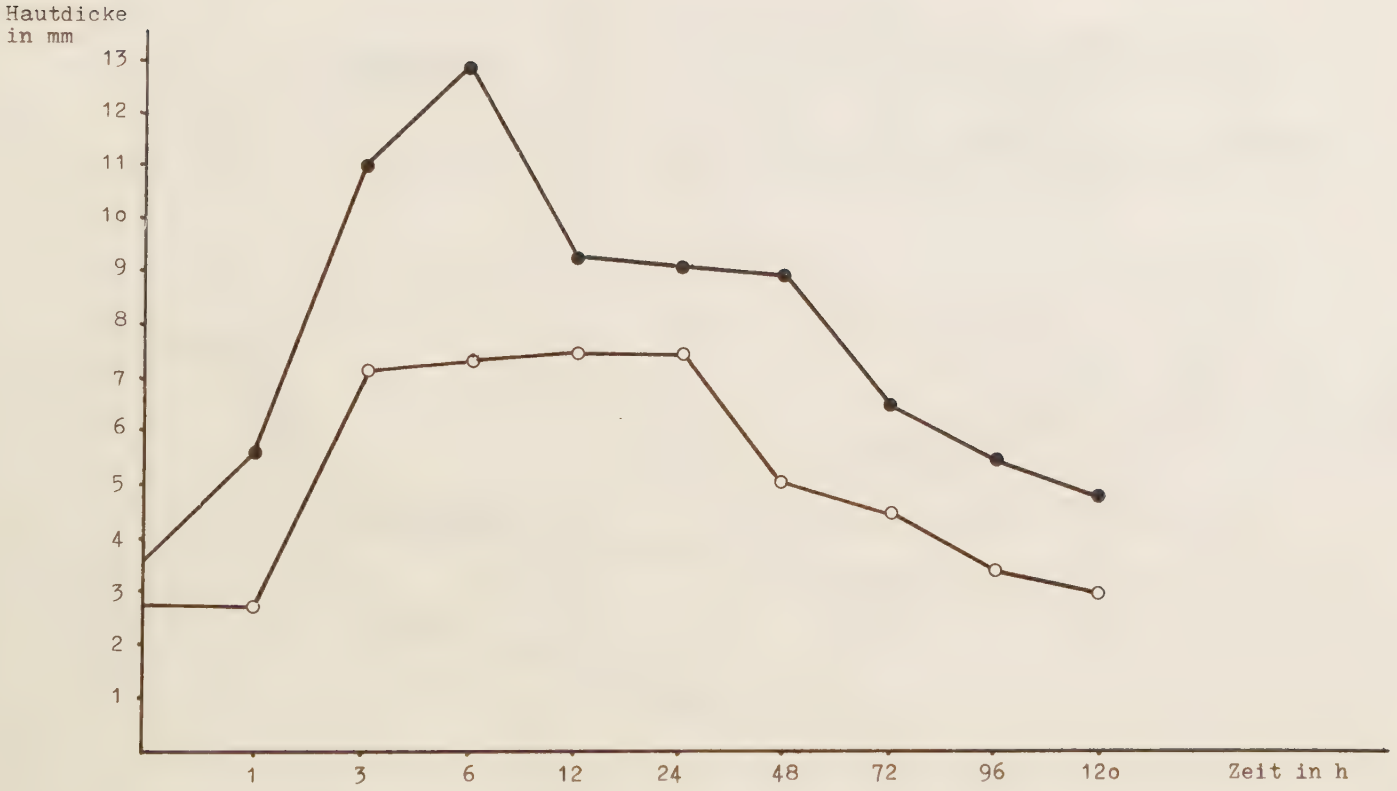

Abbildung 2 : Verlauf der Hautreaktion nach intrakutaner Applikation von PHA (0,1 mg/0,2 ml) vor ○ und nach ● Paramunisierung mit PIND-AVI, Pferd Nr. 4.

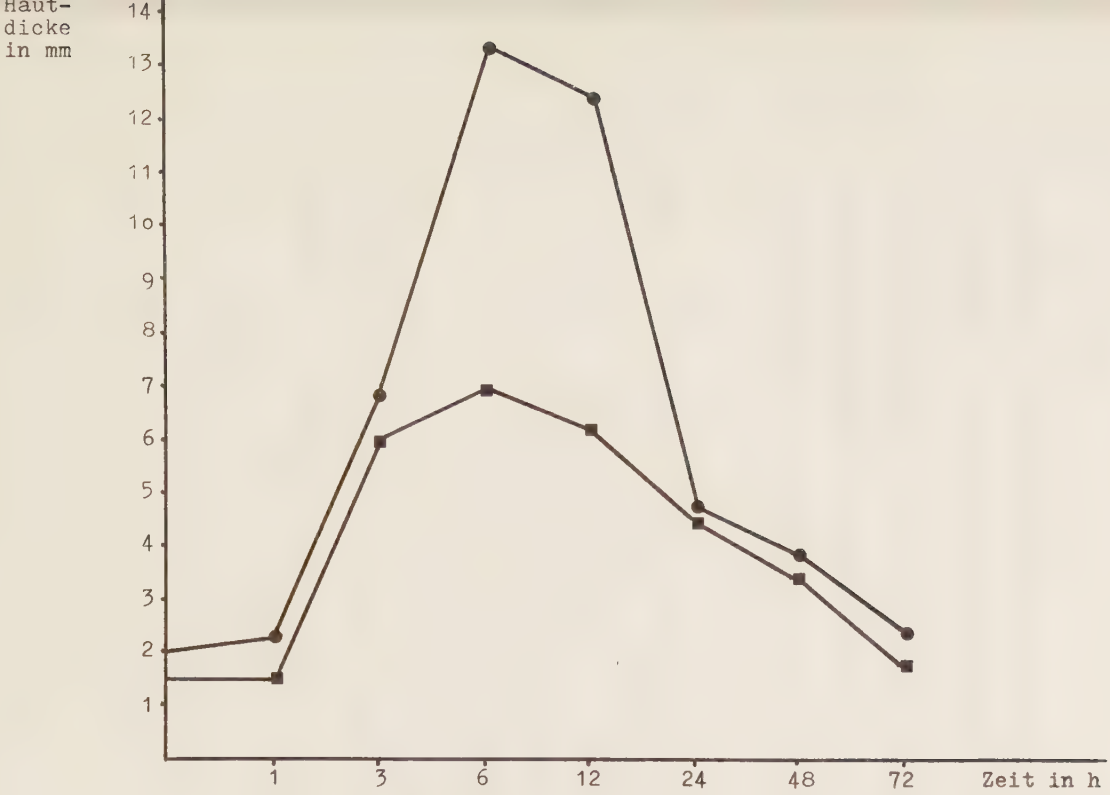

Abbildung 3 : Verlauf der Hautreaktion nach intrakutaner Applikation von PHA (o,1 mg/o,2 ml), Pferd Nr. 19 ● (Warmblutsaugfohlen, 1o Tage alt), Pferd Nr. 2o ■ (Vollblutaber-saugfohlen, 4 Tage alt).

2. 4. 2. Intrakutantest mit PIND-AVI

Diese Versuche wurden wiederum an mit PIND-AVI paramunisierten und an nicht paramunisierten Pferden durchgeführt.

PIND-AVI war in Verdünnungen zwischen 1:2 und 1:256 im Hauttest eingesetzt worden. Alle untersuchten Pferde hatten die intrakutane Applikation des Paramunitätsinducers mit einer deutlichen Zunahme der Hautdicke an der Injektionsstelle, begleitet von den Leitsymptomen einer entzündlichen, schmerzhaften Hautreaktion beantwortet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 25 und 26 sowie Abbildung 4 und 5 dargestellt.

Zwischen Hautreaktion und Inducerverdünnung bestand eine direkte Beziehung (siehe Tabelle 25 und 26). Injektion mit Inducerverdünnungen> 1:2 hatte abnehmende Hautreaktionen zur Folge. Prinzipiell war das Reaktionsoptimum zwischen 3. und 6. Stunde p. inject. erreicht.

Zwischen paramunisierten und nicht paramunisierten Pferden konnten weder qualitative noch quantitative Unterschiede hinsichtlich Ausprägung und Anbildung der Hautreaktion verzeichnet werden.

Von besonderem Interesse innerhalb dieser Untersuchungen ist die Tatsache, daß auch ein 1o Tage altes, nicht paramunisiertes Fohlen (Pferd Nr. 19; Tabelle 25) die intrakutane Applikation von PIND-AVI mit einer deutlichen Hautreaktion beantwortet hatte (siehe Abbildung 4).

Die gleichzeitige intrakutane Applikation von vermehrungsfähigem Rhinopneumonitisvirus und PIND-AVI zusammen in einem Mischungsverhältnis von 1:2 (unverdünnte Ausgangssubstanzen) hatte keine Verstärkung der Hautreaktion gegenüber der nach Verwendung der Einzelsubstanzen zur Folge gehabt.

	Pferd Nr. 17		Pferd Nr. 19		Pferd Nr. 2o	
	PIND-AVI	FHE-Kontr.	PIND-AVI	FHE-Kontr.	PIND-AVI	FHE-Kontr.
	1:2	1:4	1:2	1:4	1:2	1:4
Hautdicke in mm vor Test	2,8	2,8	2,o	2,o	1,5	1,5
nach 1 h	4,o	3,2	2,5	2,2	2,1	2,o
nach 3 h	1o,2	5,4	5,7	2,4	5,5	1,8
nach 6 h	6,o	5,1	5,5	2,2	8,o	1,6
nach 12 h	5,8	4,5	5,o	2,o	4,2	1,5
nach 24 h	5,2	3,8	2,2	-	2,o	-

Tabelle 25 : Verlauf der Hautreaktion nach intrakutaner Applikation von PIND-AVI sowie FHE-Zellüberstand als Kontrolle, Pferde Nr. 17, 19 und 2o (erwachsenes Pferd, Saugfohlen 1o und 4 Tage alt).

	Pferd Nr. 1 nach Paramunisierung mit PIND-AVI						Pferd Nr. 18 nach Paramunisierung mit PIND-AVI			
	P I N D - A V I					FHE-Kontr.	P I N D - A V I			FHE-Kontr.
	1:2	1:4	1:16	1:64	1:256	1:4	1:2	1:1o	1:2o	1:4
Hautdicke in mm vor Test	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	1,8	1,8	1,8	1,8
nach 1 h	7,6	6,4	5,7	4,6	4,4	4,2	6,o	5,2	4,o	3,4
nach 3 h	8,2	7,3	6,4	5,2	4,7	3,9	6,7	5,6	5,o	2,o
nach 6 h	5,4	4,3	3,8	3,4	3,4	3,7	4,2	3,8	3,o	2,o
nach 12 h	5,5	5,2	4,o	3,5	3,4	3,5	3,6	3,o	2,1	1,8
nach 24 h	4,o	3,6	3,4	3,4	-	3,4	2,3	2,1	1,8	-

Tabelle 26 : Verlauf der Hautreaktion nach intrakutaner Applikation von PIND-AVI und FHE-Zellüberstand als Kontrolle, Pferde Nr. 1 und 18 (erwachsenes Pferd, Fohlen 12 Tage alt) nach vorhergegangener Paramunisierung mit PIND-AVI.

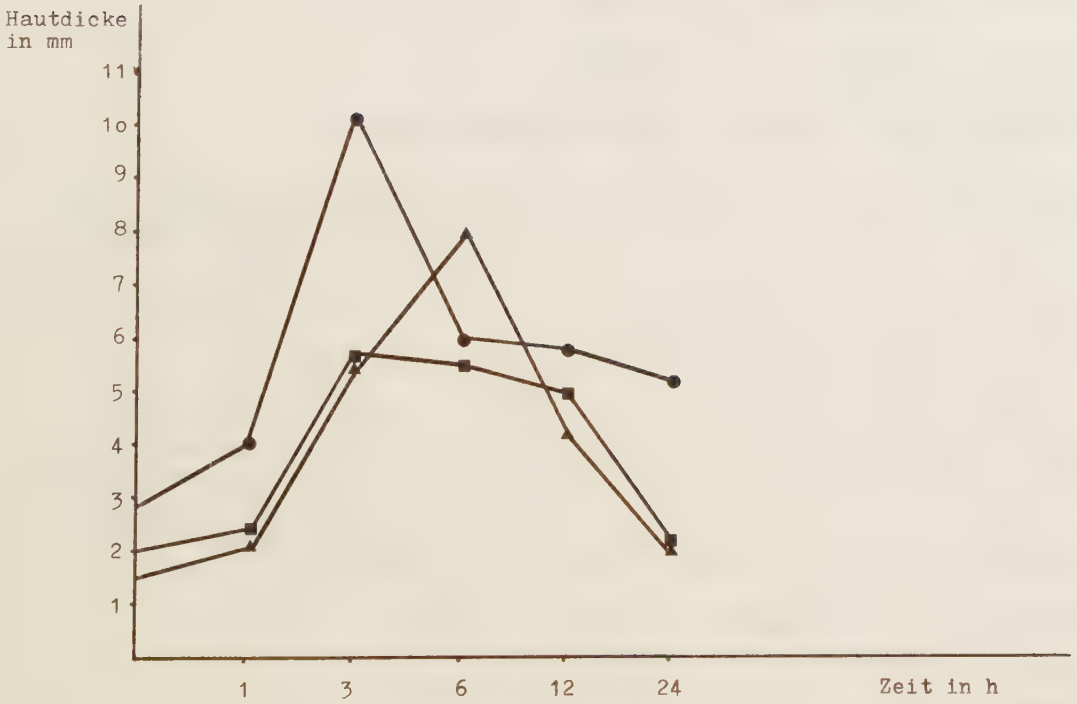

Abbildung 4 : Verlauf der Hautreaktion nach intrakutaner Applikation von PIND-AVI in einer Verdünnung von 1:2, Pferde Nr. 17 ● (erwachsen), 19 ■ und 2o ▲ (Saugfohlen).

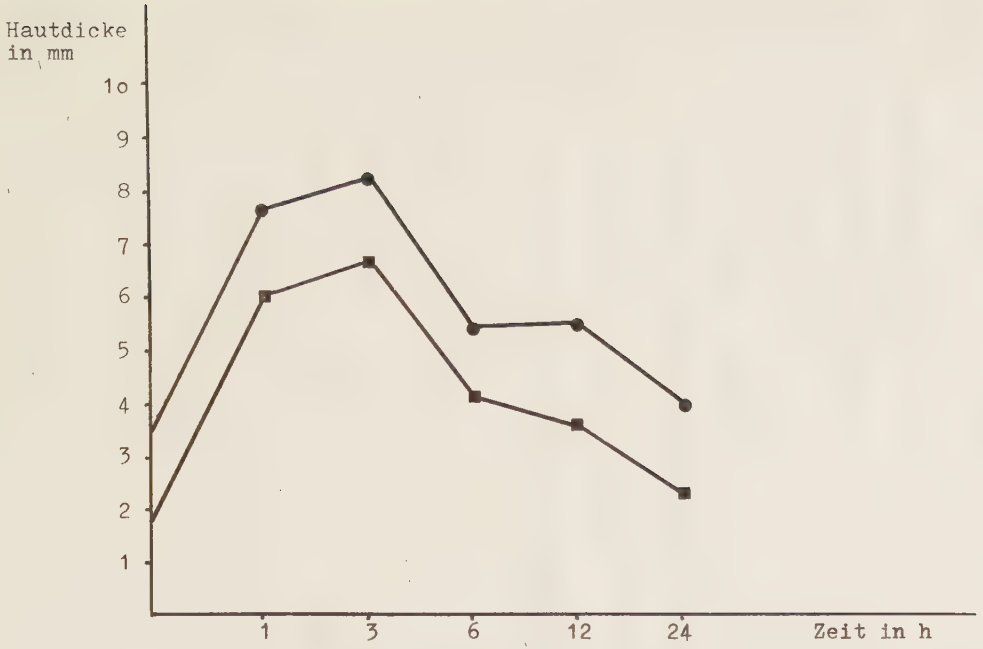

Abbildung 5 : Verlauf der Hautreaktion nach intrakutaner Applikation von PIND-AVI in einer Verdünnung von 1:2 nach Paramunisierung mit PIND-AVI, Pferde Nr. 1 ● (erwachsen) und 18 ■ (Saugfohlen).

2. 4. 3. Intrakutantest mit Rhinopneumonitisvirus

Sowohl nach Applikation von vermehrungsfähigem als auch von inaktiviertem Rhinopneumonitisvirus wurden positive Hautreaktionen verzeichnet.
In diesen Versuchen erhielten wir keinen Hinweis darauf, daß die Ausprägung der Hautreaktion in Beziehung zur Titerhöhe virusneutralisierender Antikörper der untersuchten Pferde stand.
Gegenüber dem als Kontrollantigen intrakutan applizierten zellfreien Überstand von RK_{13}-Zellen war nur in einem Falle (Pferd Nr. 17) eine Hautreaktion zu verzeichnen, die schneller auftrat und schwächer blieb als die durch EHV_1 bedingte Reaktion.
Das Viruserhaltungsmedium bewirkte in keinem Falle Hautdickenzunahme.

a) Vermehrungsfähiges Rhinopneumonitisvirus

Vermehrungsfähiges Rhinopneumonitisvirus war unverdünnt und in Verdünnungen von 1:4 und 1:16 an drei erwachsene Pferde (Nr. 1, 2, 5) intrakutan verabreicht worden. Das Virus in unverdünntem Zustand sowie in der Verdünnung von 1:4 erwies sich zur Induktion einer Hautreaktion als am besten geeignet. Der Einsatz von stärker verdünntem Virus hatte schwächere Reaktionen zur Folge.

Pferd Nr. 5, das zum Zeitpunkt des Kutantests einen Serumtiter von 1:8 aufwies, reagierte schwächer und zeitlich verzögert gegenüber Pferd Nr. 2 mit einem Titer von 1:128 (siehe Tabelle 27 und Abbildung 6).

Pferd Nr. 1 mit einem Titer von 1:96 war vor dem Hauttest dreimal im Abstand von 24 Stunden mit PIND-AVI vorbehandelt worden. Seine Hautdickenzunahme lag in etwa zwischen der der Pferde Nr. 5 und 3, der zeitliche Verlauf entsprach dem des Pferdes Nr. 2. Der Höhepunkt der Hautreaktionen der Pferde Nr. 1 und 2 wurde zur 3. Stunde post injectionem erreicht mit Persistenz bis zur 24. Stunde, bei Pferd Nr. 5 dagegen zur 12. Stunde mit Persistenz bis zur 24. Stunde. Zur 96. Stunde post injectionem waren durchschnittlich wieder normale Hautdicken zu verzeichnen.
Die Ergebnisse im Einzelnen sowie die Antikörpertiter dieser Pferde zum Zeitpunkt des Tests sind in Tabelle 27 und Abbildung 6 aufgeführt.

	Pferd Nr. 1 EHV$_1$-Titer 1:96 nach Paramunisierung mit PIND-AVI				Pferd Nr. 2 EHV$_1$-Titer 1:128				Pferd Nr. 5 EHV$_1$-Titer 1:8			
	EHV$_1$			RK$_{13}$-Kontr.	EHV$_1$			RK$_{13}$-Kontr.	EHV$_1$			RK$_{13}$-Kontr.
	uvd.	1:4	1:16	1:2	uvd.	1:4	1:16	1:2	uvd.	1:4	1:16	1:2
Hautdicke in mm vor Test	2,8	2,8	2,8	2,8	3,4	3,4	3,4	3,4	2,5	2,5	2,5	2,5
nach 1 h	4,3	3,7	3,6	3,2	6,3	5,8	5,3	3,6	4,4	4,3	3,3	2,8
nach 3 h	7,1	6,4	5,3	3,4	9,3	9,4	6,4	3,9	4,5	4,4	3,5	2,8
nach 6 h	5,2	4,6	4,5	3,6	9,3	8,2	6,1	3,8	4,9	4,6	4,2	3,o
nach 12 h	4,6	4,2	3,7	3,6	9,o	8,o	6,1	3,6	5,5	4,9	4,2	2,6
nach 24 h	3,7	3,5	3,4	3,2	8,1	6,2	4,7	3,5	5,2	3,9	3,7	2,5
nach 48 h	3,5	3,4	3,4	3,o	6,o	5,1	4,6	3,5	4,1	3,7	3,5	-
nach 72 h	3,1	3,o	2,9	2,8	3,8	3,6	3,6	3,4	4,o	3,2	2,7	-
nach 96 h	3,1	2,8	2,8	-	3,5	3,4	3,4	-	3,6	2,8	2,5	-

Tabelle 27 : Verlauf der Hautreaktion nach intrakutaner Applikation von vermehrungsfähigem Rhinopneumonitisvirus und RK$_{13}$-Zellüberstand als Kontrolle, Pferd Nr. 1 nach Paramunisierung mit PIND-AVI, Pferde Nr. 2 und 5 nicht vorbehandelt.

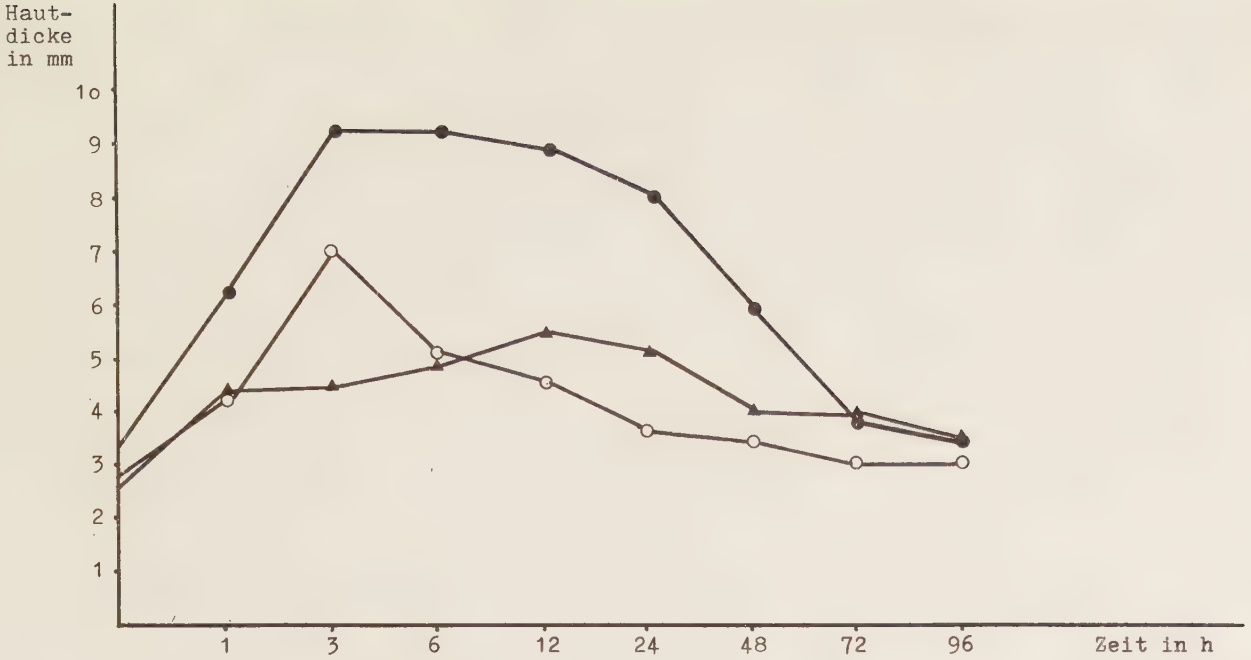

Abbildung 6 : Verlauf der Hautreaktion nach intrakutaner Applikation von vermehrungsfähigem Rhinopneumonitisvirus (unverdünnt), erwachsene Pferde Nr. 1 ○ (paramunisiert), 2 ● und 5 ▲ (nicht paramunisiert).

b) Inaktiviertes Rhinopneumonitisvirus

3 Saugfohlen (Pferde Nr. 18, 19 und 2o), eines davon mit PIND-AVI paramunisiert (Nr. 18) sowie die Mutter (Nr. 17) dieses vorbehandelten Fohlens waren mit inaktiviertem EHV_1 lediglich in unverdünnter Form intrakutan belastet worden. Die Ergebnisse dieser Versuche sowie die Titer der virusneutralisierenden Antikörper dieser Pferde zum Zeitpunkt des Tests sind in Tabelle 28 und Abbildung 7 aufgeführt.

Das mit PIND-AVI paramunisierte 12 Tage alte Fohlen reagierte bei annähernd gleichen Serumtitern als einziges im Hauttest positiv. Bei Pferd Nr. 17 war das Optimum der Hautreaktion gegenüber inaktiviertem Virus nach 24 Stunden erreicht mit Persistenz bis zur 48. Stunde post injectionem. Aus technischen Gründen (auswärtiges Gestüt) war es in diesen Fällen nicht möglich, noch Messungen zu einem späteren Zeitpunkt vorzunehmen. Das Pferd Nr. 17 reagierte auch gegenüber RK_{13}-Zellüberstand positiv. Diese Reaktion war ab der 1. Stunde post applicationem aufgetreten und früher wieder zurückgebildet als die Virusreaktion. In keinem Falle - Intrakutantest mit PHA, PIND-AVI und Rhinopneumonitisvirus - konnten neben der lokalen Hautreaktion andere klinische Anzeichen einer Allergie registriert werden.

	Pferd Nr. 17 EHV$_1$-Titer 1:2o		Saugfohlen Pferd Nr. 18 EHV$_1$-Titer 1:2o nach Paramunisierung mit PIND-AVI		Pferd Nr. 19 EHV$_1$-Titer 1:24		Pferd Nr. 2o EHV$_1$-Titer 1:14	
	EHV$_1$ uvd.	RK$_{13}$-Kontr. 1:2	EHV$_1$ uvd.	RK$_{13}$-Kontr. 1:2	EHV$_1$ uvd.	RK$_{13}$-Kontr. 1:2	EHV$_1$ uvd.	RK$_{13}$-Kontr. 1:2
Hautdicke in mm vor Test	2,8	2,8	1,8	1,8	2,o	2,o	1,5	1,5
nach 1 h	3,2	5,4	2,2	2,1	2,4	2,2	1,6	1,6
nach 3 h	5,o	6,2	3,6	2,o	2,6	2,2	1,8	1,6
nach 6 h	5,2	5,8	3,6	1,8	2,1	2,1	1,6	1,5
nach 12 h	6,7	5,3	2,8	1,8	2,o	2,o	1,5	1,5
nach 24 h	8,o	5,o	-	-	-	-	-	-
nach 48 h	6,3	3,3	-	-	-	-	-	-

Tabelle 28 : Verlauf der Hautreaktion nach intrakutaner Applikation von inaktiviertem Rhinopneumonitisvirus und RK$_{13}$-Zellüberstand als Kontrolle, Pferde Nr. 17 (erwachsen), 18, 19 und 2o (Saugfohlen, Nr. 18 mit PIND-AVI paramunisiert).

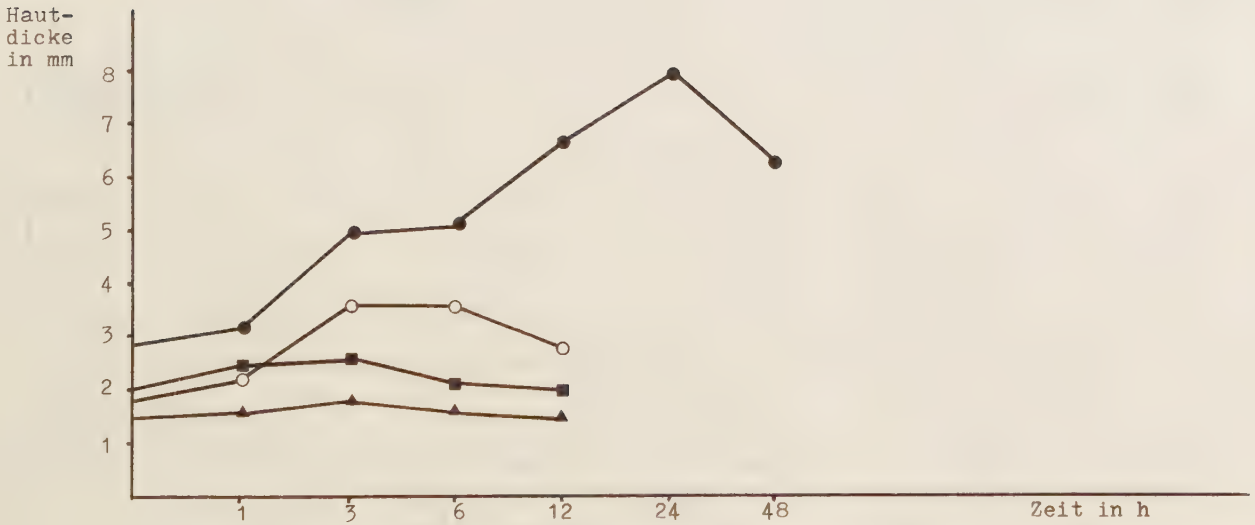

Abbildung 7 : Verlauf der Hautreaktion nach intrakutaner Applikation von inaktiviertem Rhinopneumonitisvirus (unverdünnt). Pferde Nr. 17 ● (erwachsen), 18 ○ , 19 ■ und 2o ▲ (Saugfohlen, Nr. 18 paramunisiert).

D BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit gelang es mit den gewählten Methoden, reaktionsfähige Lymphozyten des Pferdes aus dem peripheren Blut zu isolieren und in T- und B-Zellen zu differenzieren.
Die Ergebnisse verschiedener Forschergruppen (35, 39, 52, 112, 116, 184, 214), denen zufolge die T-Zellen des Pferdes im Vergleich zu den anderer Säugerspezies schwächer reagieren, konnten durch unsere Untersuchungen im E-Rosettentest und im Lymphozytentransformationstest mit PHA-P bestätigt werden.
Mit den Methoden, die wir zur Erfassung der funktionellen Seite der T-Zellen des Pferdes eingesetzt hatten, konnte durch wiederholte Untersuchungen der gleichen Individuen erstmals der Beweis für eine individuell unterschiedlich ausgeprägte Reaktionsfähigkeit der T-Zellen sowie einen rhythmischen Verlauf ("Biorhythmus") dieser Reaktion erbracht werden.
Die Ergebnisse des E-Rosettentests, für den sich nach TARR et.al. (184) sowie FRYMUS and SCHOLLENBERGER (5o) beim Pferd nur Meerschweinchenerythrozyten eignen, sind in besonderem Maße von Versuchsanordnung und -durchführung abhängig. Dennoch konnten wir mit diesem Test die großen individuellen

und zeitlichen (täglich, wöchentlich) Schwankungen erfassen.

Nach MAYR und VOGEL (116) werden durch den E-Rosettentest nur bestimmte T-Zellen erfaßt. FUDENBERG et.al. (52) sprechen deshalb beim Menschen von "active cells", die in diesem Test reagieren. Eine bestimmte Rate von T-Lymphozyten ist somit nie in der Lage, überhaupt E-Rosetten zu bilden (184). Daß es sich bei den E-Rosetten-bildenden Zellen tatsächlich um T-Lymphozyten handelt, konnten TARR et.al. (184) dadurch nachweisen, daß mit dem spezifischen T-Zell-Mitogen Phytohaemagglutinin stimulierte Lymphozyten in der Lage waren, mehr E-Rosetten zu bilden als nicht transformierte Lymphozyten (69/42 Rosetten). Auch Thymozyten zeigten in diesen Untersuchungen im Vergleich zu peripheren Lymphozyten eine höhere Rate an E-Rosetten.

Wir konnten in vitro nachweisen, daß die T-Lymphozyten eines mit dem Paramunitätsinducer PIND-AVI vorbehandelten Pferdes signifikant mehr E-Rosetten bildeten als dies vor der Paramunisierung der Fall gewesen war.

Alle Autoren sind sich einig, daß die Angabe von Standardwerten im E-Rosettentest sehr schwierig,

wenn nicht unmöglich ist. Dies konnten wir durch unsere Untersuchungen bestätigen. Der E-Rosettentest kann unseren Erfahrungen zufolge lediglich zur diagnostischen Orientierung über das Vorhandensein peripherer reaktiver T-Zellen beim Pferd eingesetzt werden.

Die in unseren wiederholten Untersuchungen festgestellten signifikant unter den Durchschnittswerten der anderen untersuchten Pferde liegenden Zahlen E-Rosetten-bildender Zellen der Pferde Nr. 5 und 16 (2 Tage altes Fohlen) werten wir in diesem Zusammenhang als Ausdruck eines Mangels an zirkulierenden reaktiven T-Lymphozyten.

Pferdelymphozyten reagieren im Lymphozytentransformationstest - dem in vitro eingesetzten Verfahren zur Untersuchung der Lymphozytenreaktion gegenüber einem bestimmten Antigen oder Mitogen - vergleichbar denen des Menschen (114) und damit schwächer als die Lymphozyten z.B. des Rindes (68, 84, 111).

Der Lymphozytentransformationstest wurde von uns zunächst erstmals vergleichend im Makro- und Mikroverfahren mit Pferdelymphozyten durchgeführt. Material- und Arbeitsaufwand konnten durch den Mi-

krotest um ein erhebliches Maß reduziert sowie die Ergebnisse dadurch sehr viel besser standardisiert werden.

Das in den Versuchen verwendete Lektin PHA-P, die Paramunitätsinducer PIND-AVI und PIND-ORF sowie Rhinopneumonitisvirus in vermehrungsfähiger und inaktivierter Form waren in der Lage, Lymphozyten der untersuchten Pferde zu transformieren. Auch in diesem Test gelang es, individuelle sowie "biorhythmische" Unterschiede zu erfassen.

In allen Tests, die später, unabhängig vom verwendeten Antigen oder Mitogen, positive Transformationsraten erbrachten, konnte schon kurze Zeit nach Versuchsansatz im Lichtmikroskop das Auftreten von "Zellanhäufungen, -proliferation", die wir als Ausdruck eingetretener Lymphozytentransformation ansehen, beobachtet werden. Möglicherweise ist dies für einen späteren diagnostischen Einsatz des Lymphozytentransformationstests von Bedeutung (frühe, "qualitative" Erkennung).

Gegenüber PHA-P konnten die besten Stimulationen verzeichnet werden, der höchste s_i aus allen Versuchen betrug 171,99.

Die in der Regel bei den untersuchten Pferden festgestellten Stimulationsindizes gegenüber PHA-P

entsprachen den von anderen Autoren (39, 177) bei dieser Spezies publizierten Ergebnissen und reichten bei großer individueller und zeitlicher Schwankung von o,83 bis 171,99.
Die quantitativ unterschiedliche Transformierbarkeit der Pferdelymphozyten zu verschiedenen Entnahmezeitpunkten wurde durch Verlaufsuntersuchungen an 2 Pferden bewiesen. Es zeigte sich hierbei, daß es innerhalb eines Rhythmus mit einem Intervall von 8 Wochen zur Reduzierung und Wiederanbildung reaktiver T-Zellen kam.
Insgesamt lagen die durch PIND-AVI erzielten Stimulationsindizes unter den Werten, die mit dem Pflanzenmitogen PHA-P erzielt werden konnten. Auch hier waren durch Verwendung separierter T-Zellen im Test bessere Stimulationsindizes zu erreichen als durch die Lymphozytengesamtfraktion.
Der höchste Stimulationsindex, den wir an isolierten T-Zellen gegenüber PIND-AVI an nicht paramunisierten Pferden registrierten, betrug 1o,92.
Mit diesen Ergebnissen ist bewiesen, daß dieser biologische Paramunitätsinducer in vitro in der Lage ist, eine T-Zell-spezifische Lymphozytentransformation beim Pferde zu induzieren. Daß diese Transformation nicht die Folge einer Immunreaktion ist,

beweisen die positiven Resultate der Pferde, die nie vorher Kontakt mit PIND-AVI hatten, unterstützt von der Beobachtung, daß die paramunisierten Pferde keine humoralen anti-HP-1-Titer bildeten. Paramunisierung mit PIND-AVI selbst hatte bei den untersuchten Pferden eine Erhöhung der Reaktivität oder eine Freimachung nicht antigengeprägter T-Lymphozyten zur Folge, was sich in vitro in ansteigenden Stimulationsindizes dieser Pferde ausdrückte. Dies erhärtet den oben angeführten Befund zur E-Rosettenbildung beim Pferd nach Paramunisierung. Die separierten T-Lymphozyten paramunisierter Pferde reagierten im Lymphozytentransformationstest ebenfalls stärker als die Gesamtlymphozytenfraktion. Mit dem Paramunitätsinducer PIND-ORF wurde in unseren Versuchen sowohl die Gesamtlymphozytenfraktion als quantitativ schwächer auch die Fraktion der isolierten B-Zellen stimuliert. Die T-Zellreaktion dagegen blieb unter der gesetzten Grenze. Diese Untersuchungen waren vergleichsweise zu PIND-AVI nur an 2 Pferden durchgeführt worden. Weiterführende Aussagen zum geschilderten Phänomen werden erst durch Folgeuntersuchungen erbracht werden können. Möglicherweise liegt der Unterschied zu PIND-AVI darin, daß es sich bei PIND-ORF um einen Inducer auf der

Grundlage eines Warmblütervirus handelt, dessen Wirkungsangriff auch über das B-Zellsystem erfolgt.

Im Intrakutantest, der als spezifischer in vivo-Test zur Feststellung der Reaktivität der T-Zellen gilt (49, 154), konnten wir sowohl gegenüber PHA als auch PIND-AVI und Rhinopneumonitisvirus in vermehrungsfähiger und inaktivierter Form positive Hautreaktionen verzeichnen. Art und zeitlicher Verlauf dieser Reaktionen gestatten den Rückschluß auf den Reaktionstyp der verzögerten Allergie (154). Somit kann PIND-AVI in vivo als Testsubstanz zum Nachweis für die Anwesenheit reaktionsfähiger T-Zellen im Organismus eingesetzt werden. Als Beweis dafür, daß der Paramunitätsinducer PIND-AVI am paramunisierten Pferd eine Erhöhung der Reaktionsfähigkeit der T-Zellen oder eine Freisetzung reaktiver T-Zellen bewirkte, sehen wir vor allem die Tatsache, daß das paramunisierte Saugfohlen (Pferd Nr. 18) im Intrakutantest auf inaktiviertes EHV_1 bei annähernd gleichen Serumtitern als einziges positiv reagierte, sowie in der erheblichen Steigerung der Hautreaktion des Pferdes Nr. 4 gegenüber PHA nach vorgeschalteter Paramunisierung.

Aus den angeführten, in in vivo- und in vitro-Tests

erhaltenen Resultaten zur Wirkungsweise von PIND-AVI ergibt sich die experimentelle Bestätigung der klinischen Erfahrungen mit PIND-AVI beim Pferd (95, 19o, 192), diesen Inducer vor allem als Infektionsprophylaktikum einzusetzen.

Die T-Zellreaktivität des Fohlens, die nach FRYMUS and SCHOLLENBERGER (5o) weniger altersabhängig verläuft als die B-Zellreaktion, konnte in unseren Fohlenversuchen durch intrakutane PIND-AVI-Applikation überprüft werden. So könnte z.B. bei Vorliegen einer kombinierten Immunmangelkrankheit des Fohlens mit gestörter Funktionsfähigkeit der T-Lymphozyten auch PIND-AVI als geeignete und ungefährliche Substanz zur raschen Diagnose mittels Intrakutantest eingesetzt werden.

Die von uns parallel durchgeführten Untersuchungen zur in vivo- und in vitro-Reaktion der T-Zellen gegenüber Rhinopneumonitisvirus in vermehrungsfähiger und chemisch inaktivierter Form zeigen, daß hinsichtlich der Stimulationsindizes gegenüber vermehrungsfähigem und inaktiviertem Virus im Lymphozytentransformationstest kein Unterschied festzustellen war. Unspezifische Reaktionen, wie sie von GERBER et.al. (55) beschrieben wurden, konnten wir nicht beobachten.

Unseren Ergebnissen zufolge ließen sich die Lymphozyten der Gesamtfraktion und die isolierten T-Zellen durch vermehrungsfähiges EHV_1 nicht deutlich besser stimulieren als durch AEI-inaktiviertes Virus.

Generell bestand der Trend, daß Pferde mit geringen EHV_1-Serumtitern (1:8 bis 1:14) gegenüber vermehrungsfähigem und inaktiviertem Rhinopneumonitisvirus gute Stimulationsindizes aufwiesen, während Pferde mit hohen Serumtitern (1:96 bis 1:128) im Lymphozytentransformationstest gegenüber EHV_1 schwächer reagierten. Diese Ergebnisse stehen in gewisser Übereinstimmung zu den von GERBER et.al. (55) beschriebenen Befunden. Die Zahl der untersuchten Pferde ist jedoch zu gering, sowie ihre Anamnesen bezüglich Impfung, Infektion etc. zu lückenhaft, als daß hieraus bereits grundlegende Schlüsse auf eine Beziehung zwischen Antikörpern und nachweisbarer Immunzellreaktion im Intrakutantest gegenüber EHV_1 gezogen werden könnten. Auch hier sprechen die erhaltenen Ergebnisse dafür, daß der Lymphozytentransformationstest und der Intrakutantest gegenüber EHV_1 sich als Diagnostikum zum

Nachweis latent EHV_1-infizierter Tiere eignen (189). Entsprechend der Beobachtung, daß es nach Paramunisierung mit PIND-AVI allen hier besprochenen Befunden zufolge zu einer Freisetzung reaktiver T-Zellen kommt, wurden im anschließenden Intrakutantest mit Virus oder Virusantigen deutlichere Reaktionen erzielt, als dies ohne Paramunisierung der Fall war. Dies beweisen die Resultate des Pferdes Nr. 1, das nach Paramunisierung eine deutliche Zunahme der Hautreaktion gegenüber EHV_1 aufwies sowie die Ergebnisse der im EHV_1-Hauttest untersuchten Saugfohlen. Ein Einsatz des Intrakutantests zur Aufdeckung latent EHV_1-infizierter Pferde scheint diesen Befunden nach nach vorgeschalteter Paramunisierung mit PIND-AVI zu deutlicheren Resultaten zu führen.
Lediglich im Falle des erwachsenen Pferdes Nr. 17, das mit positivem Ergebnis im Intrakutantest gegenüber inaktiviertem EHV_1 untersucht worden war, erhielten wir eine Hautreaktion auch gegenüber dem Zellantigen, die der Virusreaktion voranlief.
Diese Stute war 6 Monate vor Durchführung des Hauttests mit einem funktionell-synergistischen Kombinationsimpfstoff gegen Virusinfektionen der Atemwege des Pferdes (188) immunisiert worden. Dieser Impfstoff

enthält u.a. Rhinopneumonitisvirus, das auf RK_{13}-Zellen vermehrt wurde. Die Hautreaktion dieses Pferdes gegenüber dem RK_{13}-Kontrollantigen ist wahrscheinlich infolge einer humoralen Auseinandersetzung zustandegekommen. Ähnliche Beobachtungen sind von der EHV_1-Komplementbindungsreaktion an Seren geimpfter Pferde bekannt (191), bei denen häufig starke, nicht absorbierbare Mitreaktionen gegenüber dem jeweiligen Zellantigen zu beobachten sind. Alle anderen Tests waren ohne unspezifische Mitreaktionen verlaufen. Mit den besprochenen Ergebnissen konnte somit insgesamt der Nachweis dafür erbracht werden, daß an der Abwehrreaktion des Pferdes beteiligte T-Lymphozyten durch den Paramunitätsinducer PIND-AVI in vivo freigesetzt oder aktiviert und in vitro durch Inducer und Lektin nicht antigenspezifisch sowie durch EHV_1 antigenspezifisch transformiert werden können.
Vor allem der eingesetzte Lymphozytentransformationstest im Mikroverfahren in vitro und der Intrakutantest in vivo eignen sich diesen Ergebnissen nach durchaus als diagnostische Methode zur Erfassung der individuellen Reaktionslage des T-Zellsystems beim Pferd.

E Z U S A M M E N F A S S U N G

Im Dichtegradientenverfahren wurden Lymphozyten aus dem strömenden Blut von Pferden isoliert, über die Polyethylenglycoll-anti-IgG-Haftung (Panning-Verfahren) der B-Lymphozyten in T- und B-Zellen getrennt und ihre Reaktivität gegenüber pflanzlichem Mitogen (T-zellspezifisches Lektin Phytohaemagglutinin) den biologischen Paramunitätsinducern PIND-AVI und PIND-ORF sowie equinem Herpesvirus Serotyp 1(EHV_1, Rhinopneumonitisvirus) geprüft. Diese Untersuchungen wurden im E-Rosettentest und im Lymphozytentransformationstest (Mikromethode) sowohl an PIND-AVI-paramunisierten als auch an nicht paramunisierten Pferden durchgeführt. Vergleichend dazu wurde über den Intrakutantest gegenüber PHA, PIND-AVI sowie vermehrungsfähigem und inaktiviertem EHV_1 die nichtantigenspezifische und die antigenspezifische T-Zellreaktivität getestet und der Einfluß der Paramunisierung auf Ausprägung und Verlauf der Hautreaktion untersucht.

Lymphozytentransformationen (Stimulationsindex > 2) wurden gegenüber PHA-P, den Paramunitätsinducern und EHV_1 erzielt. Separierte T-Zellen reagierten hierbei stärker als die vergleichsweise untersuchte Lymphozytengesamtfraktion. Die maximal erreichten Stimulationsindizes gegenüber PHA-P betrugen 171,99, gegen-

über PIND-AVI 1o,92, gegenüber vermehrungsfähigem EHV_1 1o,85 und gegenüber inaktiviertem EHV_1 2o,79. Eine vorherige Paramunisierung mit PIND-AVI führte zu einer Aktivierung der T-Zellen, was sich in einer deutlichen Erhöhung der Stimulationsindizes ausdrückte. Die gleiche Beobachtung wurde im E-Rosettentest gemacht, der als T-Zell-spezifisch gilt.
Innerhalb dieser Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß Pferde über unterschiedliche Quantitäten reaktiver T-Zellen im peripheren Blut verfügen und somit individuell im entsprechenden in vitro-Test reagieren.
Darüberhinaus konnten wir durch Langzeituntersuchungen über 1 Jahr an bestimmten Pferden beobachten, daß es in einem Intervall von circa 8 Wochen zur Reduktion und Wiederausschleusung reaktiver, peripherer T-Zellen kommt.
Im Intrakutantest wurden positive Hautreaktionen vom Typ der verzögerten Allergie gegenüber PHA, PIND-AVI und EHV_1 erhalten. Auch hier zeigte sich, daß vorangegangene Paramunisierung zu einer deutlichen Verstärkung der Hautreaktion führte. Zwischen humoralen, virusneutralisierenden EHV_1-Antikörpern und Auftreten bzw. Ausprägung der Hautreaktion bestand keine Korrelation.

F S U M M A R Y

Experimental Investigations Concerning the Stimulation of Cells Involved in the Immune Reaction of the Horse by Paramunity Inducing Substances, Mitogen and Equid Herpesvirus 1 (EHV_1)

Peripheral lymphocytes of horses were isolated by density gradient methods. By using the panning procedure T and B-cells were separated and their reactivity has been proved against phytohemagglutinin, PIND-AVI and PIND-ORF as well as rhinopneumonitisvirus (EHV_1). These investigations were carried out by using the Erythrocyte Rosette Assay and the Lymphocyte Transformation Tests (micromethod) with lymphocytes from paramunized and non-paramunized horses. In comparison to these investigations the reaction of horses in vivo has been tested using the delayed type hypersensitivity reaction (skin-test).
The effect of paramunisation with PIND-AVI was investigated with all methods used.

Transformation ratios were obtained with PHA-P, PIND-AVI and EHV_1. Isolated T-lymphocytes showed higher stimulation indices than the mixed lymphocyte population. The highest ratios were 171,99

with PHA-P, 1o,92 with PIND-AVI, 1o,85 with life EHV_1 and 2o,79 with AEI-inactivated EHV_1. After paramunisation we could observe a clear increase of the transformation ratios.
During these investigations evidence was obtained that horses possess different quantities of peripheral T-cells. This causes individually different transformation ratios. Moreover evidence was obtained for the existence of a rhythm (8 weeks) within formation and elimination of reactive T-cells of the peripheral blood in these horses.
Skin reactions (delayed hypersensitivity) were obtained against PHA and PIND-AVI (without antigenic specifity) as well as live and inactivated EHV_1 (antigenic specifity).
Paramunisation using PIND-AVI was followed by increase of the skin-reactions. There was no correlation between appearance or formation of skin-reaction and quantity of humoral EHV_1-antibodies in the investigated horses.

G LITERATURVERZEICHNIS

1) Aiuti,F., M.V.Ciarla, C.D'Asero, R.D'Amelio and J.A.Garofalo, 1973 — Surface Markers on Lymphocytes of Patients with Infectious Diseases. Infect.Imm., 8, 11o-117

2) Aiuti,F., V.Lacava, J.A.Garofalo, R.D'Amelio and C.D'Asero, 1973 — Surface Markers on Human Lymphocytes: Studies of Normal Subjects and of Patients with Primary Immunodeficiencies. Clin.exp.Immunol., 15, 43-52

3) Albert,E.D., A.Andreas, A.McNicholas, S.Scholz and B.Kuntz, 1977 — B- and T-Cell-Specific Alloantigens in Man. Scand.J.Immunol., 6, 427-43o

4) Allison,A.C., 1974 — Interaction of Antibodies, Components and Various Cell Types in Immunity against Viruses and Pyogenic Bacteria. Transpl.Rev., 19, 3-55

5) Ammann,A.J., H.J.Meuwissen, R.A.Good and R.Hong, 197o
Successful Bone Marrow Transplantation in a Patient with Humoral and Cellular Immunity Deficiency.
Clin.exp.Immunol., 7, 343-353

6) Ammann,A.J., D.W.Wara, S.Salmon and H.Perkins, 1973
Thymus Transplantation. Permanent Reconstruction of Cellular Immunity in a Patient with Sex-Linked Combined Immunodeficiency.
New Engl.J.Med., 289, 5-9

7) Andersson,J., G.Möller and O.Sjöberg, 1972
Selective Induction of DNA Synthesis in T and B Lymphocytes.
Cell.Immunol., 4, 381

8) Andersson,J., G.M.Edelmann, G.Möller and O.Sjöberg, 1972
Activation of B-Lymphocytes by Locally Concentrated Concanavalin A.
Eur.J.Immunol., 2, 233-235

9) Andersson,J., F.Melchers, C.Galanos and O.Lüderitz, 1973 — The Mitogenic Effect of Lipopolysaccharide on Bone-Marrow-Derived Mouse Lymphocytes. Lipid A as the Mitogenic Part of the Molecule. J.exp.Med., 137, 943-953

1o) Anthony,H.M., J.A.Kirk, M.K.Madsen, M.K.Mason and G.H.Templeman, 1975 — E and EAC Rosetting Lymphocytes in Patients with Carcinoma of Bronchus. I. Some Parameters of the Test and its Prognostic Significance. Clin.exp.Immunol., 2o, 29

11) Bach,J., 1973 — Induction of T-Cells and Thymic Serum Factors in Man. Using the Rosette Technique. Transpl.Rev., 16, 196-217

12) Banks,K.L., 1973 — The Effect of Antibody on Antigen-Induced Lymphocyte Transformation. J.Immunol., 11o, 7o9-716

13) Banks,K.L. and J.B.Henson, 1973 — Quantitation of Immunoglobulin-Bearing Lymphocytes and Lymphocyte Response to Mitogens in Horses Persistantly Infected by Equine Infectious Anemia Virus. Infect.and Immunol., 8, 679-682

14) Banks,K.L. and T.C.McGuire, 1975 — Surface Receptors on Neutrophils and Monocytes from Immunodeficient and Normal Horses. Immunology, 28, 581-588

15) Banks,K.L., T.C.McGuire and T.R.Jerrells, 1976 — Absence of B Lymphocytes in a Horse with Primary Agammaglobulinemia. Clin.Immunol.Immunopath., 5, 282-29o

16) Baxley,G., G.B.Bishop, A.G.Cooper and H.H.Wortis, 1973 — Rosetting of Human Red Blood Cells to Thymocytes and Thymus-Derived Cells. Clin.exp.Immunol., 15, 385-392

17) Bentwich,Z., S.D.Douglas, F.P.Siegal and H.G.Kunkel, 1973 — Human Lymphocyte Sheep Erythrocyte Rosette Formation; Some Characteristics of the Interaction. Clin.Immunol.Immunopath., 1, 511

18) Bianco,C., R.Patrick and V.Nussenzweig, 197o — A Population of Lymphocytes Bearing a Membrane Receptor for Antigen-Antibody-Complement Complexes. J.exp.Med., 132, 7o2-72o

19) Blaese,R.M., P.Weiden, and J.J.Oppenheim, 1973 — Phytohaemagglutinin as a Skin Test for the Evaluation of Cellular Immune Competence in Man. J.Lab.Clin.Med., 81, 538-548

2o) Blaese,R.M., W.Strober and T.A.Waldmann, 1975 — Immunodeficiency in the Wiscott-Aldrich Syndrome. In: Immunodeficiency in Man and Animals, Sinauer Assoc. Inc., 25o-254

21) Blanden,R.V., 1974 — T-Cell Response to Viral and Bacterial Infection. Transpl.Rev., 19, 56-88

22) Blomgren,H. and E.Svedmyr , 1971 — In vitro Stimulation of Mouse Thymus Cells by PHA and Allogenic Cells. Cell.Immunol., 2, 285-299

23) Bona,C., C.Damais, C.Galanos and L.Chedid, 1975 — The Mitogenic Activity of Lipopolysaccharides on Lymphocytes in Culture. II. Comparative Study in Five Mammalian Species. In: Urbaschek.B., R.Urbaschek and E.Neter: Gramnegative Bacterial Infections and Mode of Endotoxin Actions. Springer Verlag, Wien-New York.

24) Bowles,C.A., G.S.White and D.Lucas, 1975 — Rosette Formation by Canine Peripheral Blood Lymphocytes. J.Immunol., 114, 399-402

25) Bøyum,A., 1964 — Separation of White Blood Cells. Nature, 21, 793-794

26) Bøyum,A., 1968 — Separation of Leucocytes from Blood and Bone Marrow. Scand.J.Clin.Lab.Invest., 21, Suppl. 97,IV

27) Brain,P., J.Gordon and W.A.Willetts, 197o — Rosette Formation by Peripheral Lymphocytes. Clin.exp.Immunol., 6, 681-688

28) Brambell,F.W.R., 197o — The Transmission of Passive Immunity from Mother to Young. American Elsevier Publishing Comp.,Inc.,New York, 196-2oo

29) Brown,G. and M.F.Greaves, 1974 — Enumeration of Absolute Numbers of T and B Lymphocytes in Human Blood. Scand.J.Immunol., 3, 161

3o) Brown,C.S., H.Halpern and H.H.Wortis, 1975 — Enhanced Rosetting of Sheep Erythrocytes by Human Peripheral Blood T-Cells in the Presence of Dextran. Clin.exp.Immunol., 2o, 5o5

31) Bruner,D.W., P.R.Edwards and E.R.Doll, 1948 — Passive Immunity in the Newborn Foal. Cornell Vet., 38, 363-366

32) Bryans,J.T., 1969 — On Immunity to Disease caused by Equine Herpesvirus I. J.Am.Vet.Med.Ass., 155, 294-3oo

33) Burgio,G.R., G.Rizzoni and E.Marni, 1968 — Age and Skin Reactivity. Lancet, 2, 411

34) Claman,H.N. and D.E.Mosier, 1972 — Cell - Cell Interactions in Antibody Production. In: Progress in Allergy Edited by P.Kallos, B.H.Waksman and A.Deweek. S.Karger, Basel, 4o-8o

35) Cockerell,G.L., S.Krakowka, E.A.Hoover, R.G.Olson and D.S.Yohn, 1976 — Characterization of Feline T and B Lymphocytes and Identification of an Experimentally induced T Cell Neoplasm in the Cat. J.Natl.Cancer Inst., 57, 9o7-913

36) Cooper,M.D., W.P.Fanek and H.H.Fudenberg, 1973 Classification of Primary Immunodeficiencies. New Engl.J.Med., 288, 966-967

37) Craddock,C.G., R.Longmine and R.McMillan, 1971 Lymphocytes and the Immune Response. New Engl.J.Med., 285, 324-331

38) Curtis,J. and F.J.Bourne, 1971 Immunoglobulin Quantitation in Sow Serum, Colostrum and Milk and the Serum of Young Pigs. Biochem.et biophys.acta, 236, 319-332

39) Dixon,J.B., D.Allan and C.R.West, 1978 The "Normal Range" and Precision of Phytohaemagglutinin-induced Equine Lymphocyte Transformation in Vitro. Res.Vet.Sc., 24, 87-91

4o) Doll,E.R., W.H.McCollum, M.E.Wallace,J.T.Bryans and M.G.Richards, 1953 Complement Fixation Reactions in Equine Virus Abortions. Am.J.Vet.Res., 14, 4o-45

41) Dutta,S.K. and W.D.Shipley, 1975 — Immunity and Levels of Neutralization Antibodies in Foals and Mares Vaccinated with a Modified Live Virus Rhinopneumonitis Vaccine. Am.J.Vet.Res., 36, 445-448

42) Dutta,S.K. and D.L.Campbell, 1977 — Cell Mediated Immunity in Equine Herpesvirus Type 1 Infection. I. In vitro Lymphocyte Blastogenesis and Serum Neutralisation Antibody in Normal Parturient and Aborting Mares. Can.J.comp.Med., 41, 404-408

43) Eisen,S.A., H.J.Wedner and C.W.Parker, 1972 — Isolation of Pure Human Peripheral Blood T-Lymphocytes using Nylon Wool Columns. Immunol.Commun., 1, 571-577

44) Escajadillo,C., and R.M.Binns, 1975 — Rosette Formation with Sheep Erythrocytes - a Possible T-Cell Marker in the Pig. Int.Archs.Allergy Appl.Im., 48, 261-275

45) Evans,J., M.A.Smith and C.M.Steel, 1975 — Glutaraldehyde and Human T-Cell Rosettes. J.Immunol.Meth., 7, 371-

46) Fallon,H., E.Frei, J.D.Davidson, J.S.Trier and D.Buck, 1962 — Leucocyte Preparations from Human Blood: Evaluation of their Morphologic and Metabolic State. J.Lab.Clin.Med., 59, 779-791

47) Fotino,M.,E.J.Merson and F.H.Allen, 1971 — Micromethod for Rapid Separation of Lymphocytes from Peripheral Blood. Ann.Clin.Lab.Sci., 1, 131-133

48) Fruchtmann,R., G.Uhlenbruck, D.O.Schmid und S.Cwik, 1977 — Zur Charakterisierung von T- und B-Lymphozyten beim Rind. Zbl.Vet.Med.,B, 24, 486-496

49) Frymus,T., S.Woyciechowska, A.Schollenberger and A.Poliwoda, 1978 — Skin Hypersensitivity to Equid Herpesvirus Type 1 in Horses. Zbl.Vet.Med.,B, 25, 431-434

5o) Frymus,T. and A.Schollenberger, 1979	Circulating B- and T-Lymphocytes in Foals During First Five Months of Life. Zbl.Vet.Med.,B, 26, 722-728
51) Fudenberg,H., R.A.Good and H.G.Goodman, 1971	Primary Immunodeficiencies: Report of a WHO Committee. Pediatrics, 47, 927-946
52) Fudenberg,H.H., J.Wybran and D.Robbins, 1975	T-Rosette-Forming Cells, Cellular Immunity and Cancer. New Engl.J.Med., 292, 475-476
53) Geha,R.S., R.S.Rosen and E.Merler, 1973	Identification and Characterization of Subpopulations of Lymphocytes in Human Peripheral Blood after Fractionation on Discontinuous Gradients of Albumin. The Cellular Defect in X-Linked Agammaglobulinemia. J.Clin.Invest., 52, 1726-1734

54) Gerber,D. and A.L.Brown, 1974 — Effect of Development and Aging on the Response of Canine Lymphocytes to Phytohaemagglutinin. Infect.&Immun., 1o, 695-699

55) Gerber,J.D., A.E.Marron, E.P.Bass and W.H.Beckenhauer, 1977 — Effect of Age and Pregnancy on the Antibody and Cell-Mediated Immune Response of Horses to Equine Herpesvirus 1. Can.J.Comp.Med., 41, 471-478

56) Githens,J.H., V.A.Fulginiti and V.Suwatte, 1973 — Grafting of Fetal Thymus and Hematopoetic Tissue in Infants with Immune Deficiency Syndromes. Transplantation, 15, 427-434

57) Greaves,M.F. and S.Bauminger, 1972 — Activation of T and B Lymphocytes by Insoluble Phytomitogens. Nature, New Biol., 235, 67-7o

58) Greaves,M.F. and G.Brown, 1974 — Purification of Human T and B Lymphocytes. J.Immunol., 112, 42o-423

59) Grewal, A.S., B.T.Rouse and L.A.Rabiuk, 1976 — Erythrocyte Rosettes - a Marker for Bovine T-Cells. Can.J.comp.Med., 4o, 298-3o5

6o) Grey,H.M., S.Colón, P.Campbell and E.Rabellino, 1972 — Immunoglobulins on the Surface of Lymphocytes. V. Quantitative Studies on the Question of whether Immunoglobulins are Associated with T Cells in the Mouse. J.Immunol., 1o9, 776-783

61) Gross,R.L., A.Latty, E.A.Williams and P.M.Newbarne, 1975 — Abnormal Spontaneous Rosette Formation and Rosette Inhibition in Lung Carcinoma. New. Engl.J.Med., 292, 439-443

62) Gürtler,L.G. and H.Cleve, 1978 — Ulex europeus Lectin - a Lymphocyte Surface Label for Human B-Cells. Proc.25th Colloquium Protides of the biological Fluids,B, 4, 715-723

63) Hall,C.B. and F.S.Kantor, 1972 — Depression of Established Delayed Hypersensitivity by Mumps Virus. J.Immunol., 108, 81-85

64) Haller,O., M.Gidlund and U.Hellström, 1977 — Mouse Natural Killer (NK) Cells Possess Receptors for Helix Pomatia A Hemagglutinin. Proc.VIII.Ann.Meeting Scand.Soc.Immunol.

65) Hammarström,S., 1973 — Binding of Helix Pomatia A Hemagglutinin to Human Erythrocytes and other Cells. Influence of Multivalent Interaction on Affinity. Scand.J.Immunol., 2, 53-66

66) Hammarström,S., U.Hellström, P.Perlmann and M.L.Dillner, 1973 — A New Surface Marker on T-Lymphocytes of Human Peripheral Blood. J.exp.Med., 138, 1270-1275

67) Hammarström,S., M.L.Dillner and P.Perlmann, 1975 — The Lack of Mitogenic Response of Neuraminidase-Treated and Untreated Human Blood Lymphocytes to Divalent, Hexavalent or Insoluble Helix Pomatia A Hemagglutinin. Exp.Cell.Res., 96, 374-383

68) Hare,W.C.D., 1963 — The in Vitro Incorporation of Tritium-3-Thymidine into the Mononuclear Cells of the Peripheral Blood of Cattle. Am.J.Vet.Res., 24, 94-97

69) Harris,R. and E.O.Ukaejiofo, 197o — Tissue Typing Using one Step Lymphocyte Separation Procedure. Brit.J.Haemat., 18, 229-235

7o) Hellström,U., P.Perlmann and E.S.Robertsson, 1978 — Receptors for Helix Pomatia A Hemagglutinin (HP) on a Subpopulation of Human B-Cells. Scand.J.Immunol., 7, 143

71) Helms,C.M. and P.Z.Allen, 1971 — A Comparative Immunological Examination of Some Immunoglobulins of Several Equine Species. Comp.Biochem.Physiol., 38, 439-449

72) Hitzig,W.H., H.E.M.Kay and H.Coltier, 1965 — Familial Lymphopenia with Agammaglobulinemia. Lancet, 2, 151-154

73) Hitzig,W.H., 1968 — In: Immunological Deficiency Disease in Man (ed.) D.Bergsman; Birth Defects Original Article Series, National Foundation Press, New York, 82

74) Hodgin,E.C., T.C.McGuire and L.E.Perryman, 1976 — Evaluation of Delayed Hypersensitivity in Normal and Immunodeficient Horses. Fed.Proc., 35, 589

75) Hodgin,E.C., T.C.McGuire, L.E.Perryman and B.D.Grant, 1978 — Evaluation of Delayed Hypersensitivity Responses in Normal Horses and Immunodeficient Foals. Am.J.Vet.Res., 39, 1161-1167

76) Hosking,C.S., M.G.Fitzgerald and M.J.Simons, 1971 — Quantified Deficiency of Lymphocyte Response to Phytohaemagglutinin in Immune Deficiency Diseases. Clin.exp.Immunol., 9, 467-476

77) Howard,R.J., A.L.Notkins and S.E.Mergenhagen, 1969 — Inhibition of Cellular Immune Reactions in Mice Infected with Lactic Dehydrogenase Virus. Nature, 221, 873-874

78) Hoyer,J.R., M.D.Cooper, A.B.Gabrielsen and R.A.Good, 1968 — In: Immunologic Deficiency Disease in Man (ed.) D.Bergsman; Birth Defects Original Article Series, National Foundation Press, New York, 91

79) Hungerford,D.A., A.J.Donelly, P.C.Nowell and S.Beck, 1959 — The Chromosome Constitution of a Human Phenotypic Intersex. Am.J.Human Genet., 11, 215-236

80) Janeway,J.A. and D.Gitlin, 1957 — Gammaglobulins. Advanced Pediat., 9, 65

81) Johansen,K.S. T.S.Johansen and D.W.Talmage, 1974 — T-Cell Rosette Formation in Primates, Pigs and Guinea Pigs. The Influence of Immunosuppressive Agents. J.Allergy Clin.Immunol., 54, (2), 86-93

82) Jondal,M., G.Holm and H.Wigzell, 1972 — Surface Markers on Human T and B Lymphocytes. I. A Large Population of Lymphocytes Forming Nonimmune Rosettes with Sheep Red Blood Cells. J.exp.Med., 136, 207-215

83) Julius,M.H., E.Simpson and L.A.Herzenberg, 1973 — A Rapid Method for the Isolation of Functional Thymus-derived Murine Lymphocytes. Eur.J.Immunol., 3, 645-649

84) Kaneko,J.J., W.S.Tyler, G.H.Theilen and O.W.Schalm, 1960 — Autoradiographic Studies of Normal and Leukemic Bovine Leukocytes. Am.J.Vet.Res., 21, 230-232

85) Kaplan,M.E. and C.Clark, 1974 — An Improved Rosetting Assay for Detection of Human T-Lymphocytes. J.Immunol.Meth., 5, 131

86) Kaupp,E., R.Pabst and F.Trepel, 1977 — Rosette Formation of Pig Peripheral Blood Lymphocytes with Sheep Red Blood Cells. Z.Immun.Forschg., 152, 438-446

87) Kaura,Y.K., R.Pandey and V.K.Sharma, 1979 — Rosette Formation by Buffalo (Bos Bubalis) T and B Lymphocytes. Vet.Rec., 104, 386-387

88) Kersey,J.H. and K.J.Gail-Peczalska, 1975 — T and B Lymphocytes in Humans - a Review. Am.J.Pathol., 81, 446-457

89) Kissmeyer-Nielsen F. and K.E.Kjerbye, 1967 — Lymphocytotoxic Micro Technique. Purification of Lymphocytes by Flotation. Histocompatibility Testing, Munksgaard, Copenhagen, 381-383

90) Klaus,G.G.B., A.Bennett and E.W.Jones, 1969 — A Quantitative Study of the Transfer of Colostral Immunoglobulins to the Newborn Calf. Immunology, 16, 293-299

91) Kobielowa,Z.,B.Myfar, J.Pietrzyk, Z.Snopkiewicz and M.Zembala, 1977 — T and B Lymphocytes in Peripheral Blood of Healthy Children. Ped.Pol., 52, 1343-1348

92) Lassila,O., T.Nurmi and J.Eskola, 1979 — Genetic Differences in the Mitogenic Response of Peripheral Blood Lymphocytes in the Chicken. J.Immunogenetics, 6, 37-43

93) Lay,W.H. and V.Nussenzweig, 1968 — Receptors of Complement on Leucocytes. J.exp.Med., 128, 991-1007

94) Lay,W.H., N.F.Mendes, C.Bianco and V.Nussenzweig, 1971 — Binding of Sheep Red Blood Cells to a Large Population of Human Lymphocytes. Nature, 230, 531-532

95) Leistner, W., 198o — Untersuchungen über die Wirksamkeit des Paramunitätsinducers "PIND-AVI" an ausgewählten Krankheiten des Pferdes (Auswertung eines Feldversuches). Vet.Med.Diss.München

96) Lew,A.M., C.S.Hosking and M.J.Studdert, 198o — Immunologic Aspects of Combined Immunodefficiency Disease in Arabian Foals. Am.J.Vet.Res., 41, 1161-1166

97) Lohmann,H.P., L.Novikovs and R.G.Graw jr., 1974 — Cellular Interactions in the Proliferative Response of Human T and B Lymphocytes to Phytomitogens and Allogenic Lymphocytes. J.exp.Med., 139, 1553-1567

98) Mage,M.G. L.L.McHugh and T.L.Rothstein, 1977 — Mouse Lymphocytes with and without Surface Immunoglobulin: Preparative Scale Separation in Polystyrene Tissue Culture Dishes Coated with Specifically Purified Anti-immunoglobulines. J.Immunol.Meth., 15, 47-56

99) Magnuson,N.S., T.C.McGuire, K.L.Banks and L.E.Perryman, 1978 — In Vitro and in Vivo Effects of Corticosteroids on Peripheral Blood Lymphocytes from Ponies. Am.J.Vet.Res., 39, 393-398

1oo) Mason,J.H., T.Dalling and W.S.Gordon, 193o — Transmission of Maternal Immunity. J.Path.a.Bact., 33, 783-797

1o1) Mayr,A., P.A.Bachmann, B.Bibrack und G.Wittmann, 1974 — Virologische Arbeitsmethoden, Band I Gustav Fischer Verlag, Stgt.

1o2) Mayr,A., 1977 — Aktive Praemunisierung, I und II. Kleintierpraxis, 22, 85-87, 131-136

1o3) Mayr,A. und J.Sailer, 1977 — Neue Schwerpunkte bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten. Wehrmed.Mschr., 21, 198

1o4) Mayr,A., 1978 — Bekämpfung der wichtigsten akuten Viruskrankheiten der Kälber in der BRD. Berl.Mchn.Tierärztl.Wschr., 91, 181

1o5) Mayr,A., 1978 — Praemunität, Prämunisierung und paraspezifische Wirkung von Schutzimpfungen. Mchn.Med.Wschr., 12o, 239-242

1o6) Mayr,A., 1978 — Kerninformation über PIND-AVI. Materialsammlung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztl. Fakultät der Universität München.

1o7) Mayr,A., 1979 — Entwicklung neuer Immunisierungs- und Paramunisierungsverfahren in der Tiermedizin. Die blauen Hefte, 6o, 494-51o

1o8) Mayr,A., 1979 — Erfahrungen mit dem Paramunitätsinducer PIND-AVI in der Tiermedizin. Der prakt.Tierarzt, Collegium Veterinarium

1o9) Mayr,A., H.Raettig, H.Stickl und M.Alexander, 1979 — Paramunität, Paramunisierung, Paramunitätsinducer, Teil I und II. Fortschr.d.Med., 97, 1158-1165, 12o5-121o

11o) Mayr,A., 198o — Kerninformation über PIND-ORF. Materialsammlung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztl. Fakultät der Universität München.

111) [illegible], Untersuchungen über proliferierende periphere Blutzellen beim Kalb. Zbl.Vet.Med.,A, 25, 634-639

112) Mayr,B. und W.Schleger, 1978 — Untersuchungen über Erythrozytenrosetten bildende periphere T-Zellen bei Rind, Schwein und Pferd. Berl.Mchn.Tierärztl.Wschr., 91, 437-439

113) Mayr,B. und W.Schleger, 1979 — Untersuchungen über oberflächenimmunglobulintragende Lymphozyten bei Rind, Schwein und Pferd. Berl.Mchn.Tierärztl.Wschr., 86, 65-66

114) Mayr,B., G.W.Niebauer, W.Gebhart, G.Hofecker, A.Kügl und W.Schleger, 1979 — Untersuchungen an peripheren Leukozyten melanomtragender und melanomfreier Schimmelpferde verschiedener Altersstufen. Zbl.Vet.Med.,A, 26, 417-424

115) Mayr,B., T.Radaszkiewicz, W.Schuller, C.Hofecker, K.Wampl und W.Schleger, 1979 — DNA-Synthesestudien an peripherem Schweineblut. Zbl.Vet.Med.,A, 26, 386-392

116) Mayr,B. und I.Vogel, 198o — Lymphozytenpopulationen bei Rind, Schwein und Pferd - eine Übersicht. Wien.tierärztl.Mschr., 67, 1o6-11o

117) McClure,J.J., C.C.Muscoplat, D.W.Johnson and D.R.Senogles, 1978 — Microculture Method for mixed Lymphocyte Cultures in Horse. Am.J.Vet.Res., 39, 337-339

118) McGuire,T.C. and T.F.Crawford, 1972 — Identification and Quantification of Equine Serum and Secretory Immunoglobuline. A.Infect.a.Imm., 6, 61o-615

119) McGuire,T.C. and I.D.Henson, 1972 — Equine Infectious Anemia. Pathogenesis of Persistent Viral Infection. Prosp.Virol., 8, 228-244

120) McGuire,T.C. and T.B.Crawford, 1973 — Passive Immunity in the Foal: Measurement of Immunoglobulin Classes and Specific Antibody. Am.J.Vet.Res., 34, 1299-1303

121) McGuire,T.C. and M.J.Poppie, 1973 — Hypogammaglobulinemia and Thymic Hypoplasia in Horses: A Primary Combined Immunodeficiency Disorder. Infect.Immun., 8, 272-277

122) McGuire,T.C., M.J.Poppie and K.L.Banks, 1974 — Combined (B- and T-Lymphocyte) Immunodeficiency: A Fatal Genetic Disease in Arabian Foals. J.Am.Vet.Med.Assoc., 164, 70-76

123) McGuire,T.C., K.L.Banks and M.J.Poppie, 1975 — Combined Immunodeficiency in Horses: Characterization of the Lymphocyte Defect. Clin.Immun.Immunopath., 3, 555-566

124) McGuire,T.C., K.L.Banks and M.J.Poppie, 1975 — Animal Model of Human Disease: Combined Immunodeficiency in Horses. Am.J.Pathol., 80, 551-554

125) McGuire,T.C., M.J.Poppie and K.L.Banks, 1975 — Hypogammaglobulinemia Predisposing to Infection in Foals. J.Am.Vet.Med.,A, 166, 71-75

126) McGuire,T.C., K.L.Banks, D.R.Evans and M.J.Poppie, 1976 — Agammaglobulinemia in a Horse with Evidence of Functional T-Lymphocytes. Am.J.Vet.Res., 37, 41-46

127) Miller,J.F.A.P., A.Basten, J.Spreut and C.Cheers, 1971 — Interaction Between Lymphocytes in Immune Response. Cell.Immunol., 2, 469-495

128) Müller,J., G.Brun del Re, H.Buerki, H.W.Keller, M.W.Hess and H.Cottier, 1975 — Nonspecific Acid Esterase Activity. Criterion for Differentiation of T and B Lymphocytes in Mouse Lymph Nodes. J.Immunol., 5, 27o-272

129) Newell,D.O., S.Noath and I.C.Smith, 1976 — The Scanning Electron Microscopy of Normal Human Peripheral Blood Lymphocytes. Brit.J.Haematol., 32, 309-315

130) Notkins,A.L., 1974 — Immune Mechanisms by which the Spread of Viral Infections is stopped. Cell.Immunol., 11, 478-483

131) Nowell,P.C.,1960 — Phytohaemagglutinin: An Initiator of Mitosis in Cultures of Normal Human Lymphocytes. Cancer Res., 20, 462

132) Olson,G.B., P.B.Dent, W.E.Rawes, M.A.South, J.R.Montgomery, J.L.Melnick and R.A.Good, 1968 — Abnormalities of in Vitro Lymphocyte Responses during Rubella Virus Infections. J.exp.Med., 128, 47-68

133) Oppenheim,J.J. and D.L.Rosenstreich, 1976 — Mitogens in Immunobiology. Academic Press, New York

134) Otto,F. und D.O.Schmid, 197o
Lymphozytenisolierung aus dem Blut des Menschen und der Tiere.
Blut, 21, 118-122

135) Pachciarz,J.A., 1976
Cellular Immunity to Equine Rhinopneumonitis Virus in Infected Yearlings and Pregnant Mares (Abstract).
Fed. Proc., 35, 489

136) Pahud,J.J. and J.P.Mach, 1972
Equine Secretory IgA and Secretory Component.
Interact.Arch.Allergy, 42, 175-186

137) Pawlas,S., 1979
Untersuchungen zur Charakterisierung der Lymphozytenpopulationen von Schwein und Rind.
Vet.Med.Diss.München

138) Peavy,D.L., J.W.Shands, W.H.Adler and R.T.Smith, 1973
Selective Effects of Bacterial Endotoxins on Various Subpopulations of Lymphoreticular Cells.
J.Infect.Diseases, 128 Suppl., 91-99

139) Perryman,L.E., T.C.McGuire and B.J.Hilbert, 1977 — Selective Immunoglobulin M Deficiency in Foals. J.Am.Vet.Med. A., 17o, 212-215

14o) Perryman,L.E., T.C.McGuire, M.J.Poppie and K.L.Banks, 1978 — Primary Immunodeficiency Disorders in Foals: Pathogenesis and Differential Diagnosis. In: Equine Infectious Diseases, IV, Princeton, Veterinary Publications Inc., 279-286

141) Perryman,L.E., T.C.McGuire and R.L.Torbeck, 198o — Ontogeny of Lymphocyte Function in the Equine Fetus. Am.J.Vet.Res., 41, 1197-12oo

142) Peter,H.H., J.Pavie-Fischer, W.H.Fridman, C.Aubert, J.P.Cesarini, R.Roubin and T.M.Kourilsky, 1975 — Cell-Mediated Cytotoxicity in Vitro of Human Lymphocytes against a Tissue Culture Melanoma Cell Line (IGR3). J.Immunol., 115, 539-548

143) Phillipps,B. and I.Roitt, 1973 — Evidence for Transformation of Human B Lymphocytes by PHA. Nature New Biol., 241, 254-256

144) Polliak,A., N.Lampen, B.D.Clarkson and E.de Harren, 1973 — Identification of Human B and T Lymphocytes by Scanning Electron Microscopy. J.exp.Med., 138, 607-624

145) Polson,A., 1943 — Variation of Serum Composition with the Age of Horses as shown by Electrophoresis. Nature, 152, 413-414

146) Pyke,K.W., H.M.Dosch and M.M.Ipp, 1975 — Demonstration of an Intrathymic Defect in a Case of Severe Combined Immunodeficiency Disease. N.Eng.J.Med., 293, 424-428

147) Rabellino,E., S.Colón, H.M.Grey and E.R.Unanue, 1971 — Immunoglobulins on the Surface of Lymphocytes. I. Distribution and Quantitation. J.exp.Med., 133, 156-157

148) Raff,M.C., 197o — Two Distinct Populations of Peripheral Lymphocyte in Mice Distinguishable by Immunofluorescence. Immunology, 19, 637-65o

149) Reeves,J.H. and H.W.Renshaw, 1979 — Surface Membrane Markers on Bovine Peripheral Blood Lymphocytes. Am.J.Vet.Res., 39, 917-923

15o) Reisner,Y., A.Ravid and N.Sharon, 1976 — Use of Sojabean Agglutinin for the Separation of Mouse B and T Lymphocytes. Biochem.Biophys.Res.Commun., 72, 1585

151) Reyero,C., I.G.Thalhammer, G.Reszler and W.Stöckl, 1978 — Development of Peripheral B and T Lymphocytes in Piglets. Z.Immun.-Forschg., 154, 4o9-415

152) Robinson,J.E., 1975 — Severe Combined Immunodeficiency Treated with Bone Marrow Graft. Proc.R.Soc.Med., 68, 23-24

153) Rocky,J.H., 1967 — Equine Antihapten Antibody. The Submits and Fragments of Purified Anti-B-Lactoside Antibody. J.exp.Med., 125, 249-275

154) Rolle,M. und A.Mayr, 1978 — Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre für Tierärzte, Biologen und Agrarwissenschaftler. Enke Verlag, Stuttgart.

155) Rosen,F.S., S.P.Gotoff, J.M.Craig, J.Ritchie and C.A.Janeway, 1966 — Further Observations on the Swiss Type of Agammaglobulinemia (Alymphocytosis). The Effect of Syngeneic Bone-Marrow Cells. New Engl.J.Med., 274, 18-21

156) Ross,G.D., V.M.Rabellino, L.J.Polley and H.M.Grey, 1973
Combined Studies of Complement Receptor and Surface Immunoglobulin-Bearing Cells and Sheep Erythrocyte Rosette-Forming Cells in Normal and Leukemic Human Lymphocytes. J.Clin.Invest., 52, 377-385

157) Rouse,B.T. and D.G.Ingram, 197o
The Total Protein and Immunoglobulin Profile of Equine Colostrum and Milk. Immunology, 19, 9o1.9o7

158) Rouse,B.T., 1971
The Immunoglobulins of Adult Equine and Foal Sera: A Quantitative Study. Brit.Vet.J., 127, 45-52

159) Rouse,B.T. and L.A.Babiuk, 1974
Host Defense Mechanisms against Infectious Bovine Rhinotracheitis-virus. Isolation and Immunological Activities of Bovine T-Lymphocytes. J.Immunol., 113, 1391-1398

160) Rouse,B.T. and L.A.Babiuk, 1977 — The Direct Antiviral Cytotoxicity by Bovine Lymphocytes is not Restricted by Genetic Incompatibility of Lymphocytes and Target Cells. J.Immunol., 118, 618-624

161) Salvin,S.B., M.B.Gregg and R.F.Smith, 1962 — Hypersensitivity in Newborn Guinea Pigs. J.exp.Med., 115, 7o7-722

162) Saulsbury,F.T., J.A.Winkelstein and L.E.David, 1975 — Combined Immunodeficiency and Vaccine-Related Poliomyelitis in a Child with Cartilage-Hair Hypoplasia. J.Pediatr., 86, 868-972

163) Scheid,R., 1975 — Untersuchungen zur Inaktivierung des Rhinopneumonitisvirus bei Erhalt der immunisierenden Eigenschaften. Vet.Med.Diss.München

164) Schiff,R.I., R.H.Buckley, R.B.Gilbertsen and R.S.Metzgar, 1974
Membrane Receptors and in Vitro Responsiveness of Lymphocytes in Human Immunodeficiency. J.Immunol., 112, 376-386

165) Schlossman,S.F. and L.Hudson, 1973
Specific Purification of Lymphocyte Populations in a Digestible Immunoadsorbent. J.Immunol., 110, 313-315

166) Scholle,H., W.Schlag und H.Rühl, 1972
Vergleichende Untersuchung verschiedener Methoden zur Isolierung peripherer menschlicher Lymphozyten. Blut, 24, 54-57

167) Schrek,R. and S.S.Stejanai, 1963
Lymphocytic and Intradermal Reactions to Phytohemagglutinin. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 22, 428

168) Schulman,J.L., 1975
Immunology of Influenza. In: E.Kilbourne (ed.): The Influenzaviruses and Influenza. Academic Press, New York, 373-393

169) Seiler,F.R., H.H.Sedlacek, E.J.Kanzy und W.Lang, 1972
Über die Brauchbarkeit immunologischer Nachweismethoden zur Differenzierung funktionell verschiedener Lymphozyten: Spontanrosetten, Komplementrezeptor-Rosetten und Immunglobulinrezeptoren.
Behring Institut Mitteilungen, 52, 26-72

17o) Seligmann,M., H.H.Fudenburg and R.A.Good, 1968
A Proposed Classification of Primary Immunologic Deficiency.
Am.J.Med., 45, 817-825

171) Shimizu,M., I.C.Pan and W.R.Hess, 1976
T and B Lymphocytes in Porcine Blood.
Am.J.Vet.Res., 37, 3o9-317

172) Soothill,J.F., 1968
Immunoglobulins in First-Degree Relative of Patients with Hypogammaglobulinemia, Transient Hypogammaglobulinemia: A Possible Manifestation of Heterozygocity.
Lancet, 1, 1oo1-1oo3

173) Spearman,C. and G.Kaerber, 1968 — Wertbemessung biologisch wirksamer Substanzen auf Grund alternativer Dosis-Wirkungs-Kurven. In: Lothar Sachs, Statistische Auswertungsmethoden, Verlag A.Springer,Berlin-Heidelberg-New York, 225-229

174) Splitter,G.A., L.E.Perryman, N.S.Magnuson and T.C.McGuire, 1980 — Combined Immunodeficiency of Horses: A Review. Dev.a.Comp.Immunol., 4, 21-32

175) Stadecker,M.J., G.Bishop and H.H.Fortis, 1973 — Rosette Formation by Guinea Pig Thymocytes and Thymus-Derived Lymphocytes with Rabbit Red Blood Cells. J.Immunol., 111, 1834-1837

176) Starr,S. and S.Berkovich, 1964 — Effects of Measles, Gamma Globulin Modified Measles and Vaccine Measles on the Tuberculin Test. New Engl.J.Med., 270, 386-391

177) Steele,R.W., C.Limas and G.B.Thurman, 1972 — Familial Thymic Aplasia. New Engl.J.Med., 287, 787-791

178) Stickl,H. und A.Mayr, 1979 — Über die Wirksamkeit eines neuen Paramunitätsinducers (PIND-AVI) für Mensch und Tier. Fortschr.d.Med., 97, 1781-1788

179) Stobo,J.D., A.S.Rosenthal and M.E.Paul, 1972 — Functional Heterogeneity of Murine Lymphoid Cells. I.Responsiveness to and Surface Binding of Concanavalin A and Phytohemagglutinin. J.Immunol., 108, 1-17

180) Swanborg,R.H., U.Hellström and H.Perlman, 1977 — A New Rat Lymphocyte Surface Marker: Characterization and Separation of Cells with Receptors for Helix Pomatia Hemagglutinin. Scand.J.Immunol., 6, 235-239

181) Takashima,I., C.Olson, D.M.Driscoll and L.E.Baumgartner, 1977 — B-Lymphocytes and T-Lymphocytes in Three Types of Bovine Lymphosarcoma. J.Natl.Cancer Inst., 59, 1205-1209

182) Targowski,S.P., 1975 — Serum Immunoglobulin, Dermal Response, and Lymphocyte Transformation Studies in Horses with Chronic Diarrhea. Infect.Immunol., 12, 48-54

183) Targowski,S.P., 1976 — Separation of Mononuclear Leucocytes and Polymorphonuclear Leucocytes from Equine Blood. Can.J.comp.Med., 40, 285-290

184) Tarr,M.J., R.G.Olsen, G.S.Krakowa, G.L.Cockerell and A.A.Gabel, 1977 — Erythrocyte Rosette Formation of Equine Peripheral Blood Lymphocytes. Am.J.Vet.Res., 38, 1775-1779

185) Taylor,R.B., P.H.Duffus and M.C.Raff, 1971 — Redistribution and Pinocytosis of Lymphocyte Surface Immunglobulin Molecules Induced by Anti-Immunglobulin Antibody. Nature New Biol., 233, 225

186) Taylor,D., Y.Hokama and S.F.Perri, 1975 — Differentiating Feline T and B Lymphocytes by Rosette Formation. J.Immunol., 115, 862-865

187) Thein,P. und G.Härtl, 1976 — Untersuchungen zur Virusätiologie respiratorischer Erkrankungen des Pferdes. Der prakt. Tierarzt, Collegium Veterinarium, 4/77, 24-29

188) Thein,P., 1979 — Experimentelle Untersuchungen über Reoviren beim Pferd. Vorkommen, Verbreitung, Klinik, Pathogenese, Infektketten, Schutzimpfung. Vet.Med.Habilitationsschrift, München

189) Thein,P., 1980 — Herpesvirusinfektion bei Mensch und Tier, ihre Problematik und Bekämpfung. Berl.Mchn.Tierärztl.Wschr., 93, 201-205

190) Thein,P., W.Leistner und H.Hechler, 1980 — Erfahrungen mit dem Einsatz des Paramunitätsinducers PIND-AVI in der Pferdepraxis. Zbl.Vet.Med.,B, 27, 499-512

191) Thein,P., 198o — Komplementbindungsreaktion mit Rhinopneumonitisvirus. Persönliche Mitteilung

192) Thein,P., 1981 — Zur Prophylaxe der Fohlenlähme. Der prakt. Tierarzt, im Druck

193) Thompson,D.B., M.J.Studdert, R.G.Beilharz and I.R.Littlejohns, 1975 — Inheritance of a Lethal Immunodeficiency Disease of Arabian Foals. Aust.Vet.J., 51, 1o9-113

194) Uhlenbruck,G., P.Wernet and K.Schumacher, 1973 — Specific T-Cell Marking by Helix Pomatia Agglutinin after Neuraminidase Treatment. Klin.Wschr., 51, 121o-1211

195) Unanue,E.R., H.M.Grey, B.Rabellino, P.Campbell and J.Schmidtke, 1971 — Immunoglobulins on the Surface of Lymphocytes. II. The Bone Marrow as the Main Source of Lymphocytes with Detectable Surface-Bound Immunoglobulin. J.exp.Med., 133, 1188-1198

196) Vaerman,J.P., P.Querinjean and J.F.Heremans, 1971 — Studies on the IgA System of the Horse. Immunology, 21, 443-454

197) Vaiman,M., C.Renard, M.Poncean, J.Lecointre et P.A.Villiers, 1975 — Alloantigenes sous la dependance de la region SL-A controlant la reaction lymphocytaire mixte chez le porc. C.R.Acad.Sc.Paris, 28o, 28o9-2812

198) Valdimarsson,H., G.Agnars do Hir and P.J.Lachmann, 1975 — Measles Virus Recepture on Human T Lymphocytes. Nature, 255, 554-556

199) Van Dam,R.H., P.J.S. van Kooten and J.A. van der Donk, 1978 — In Vitro Stimulation of Goat Peripheral Blood Lymphocytes: Optimization and Kinetics of the Response to Mitogens and to Allogeneic Lymphocytes. J.Immunol.Meth., 21, 217-228

2oo) Vassar,P.S., E.M.Levy and D.E.Brooks, 1976 — Studies on the Electrophoretic Separability of B and T Lymphocytes. Cell.Immunol., 21, 257-271

2o1) Vautherot,J. et H.Salmon, 1977
Adsorption Elective des Erythrocytes de Cobaye sur Differentes Sous-Populations Leucocytaires du Cheval.
Bull.Acad.Vét.de France, 5o, 293-3o2

2o2) Virelizier,J.L., R.Postlethwaite, G.C.Schild and A.C.Allison, 1974
Antibody Responses to Antigenic Determinants of Influenza Virus Hemagglutinin. I. Thymus Dependence of Antibody Formation and Thymus Independence of Immunological Memory.
J.exp.Med., 14o, 1559-157o

2o3) Waldmann,T.A., S.Broder, M.Burn, B.Meade, R.Krakauer, M.Blackman and C.Goldman, 1976
T Cell Suppression of Pokeweed Mitogen Induced Immunoglobulin Production.
In: Oppenheim and Rosenstreich Mitogens in Immunobiology

2o4) Waxdal,M.J., S.F.Nilsson and T.Y.Basham, 1976
Heterogeneity of the Pokeweed Mitogens and the Responding Lymphocytes.
In: Oppenheim and Rosenstreich Mitogens in Immunobiology

2o5) Weiland,F. und O.C.Straub, 1975 — Frequency of Surface Immunoglobulin Bearing Blood Lymphocytes in Cattle Affected with Bovine Leukosis. Res.Vet.Sc., 19, 1oo-1o2

2o6) Werner,C.H., P.T.Klonda, M.C.Correa, P.Vassalli and M.Jeannet, 1977 — Isolation of B and T Lymphocytes by Nylon Fiber Columns. Tissue Antigens, 9, 227-229

2o7) Wigzell,H., K.G.Sundquist and T.O.Yoshida, 1972 — Separation of Cells According to Surface Antigens by the Use of Antibody-Coated Columns. Fractionation of Cells Carrying Immunoglobulins and Blood Group Antigens. Scand.J.Immunol., 1, 75-87

2o8) Wilks,C.R. and L.Coggins, 1976 — Immunity to Equine Herpesvirus Type 1 (Rhinopneumonitis): In Vitro Lymphocyte Response. Am.J.Vet.Res., 37, 487-492

209) Wilks,C.R. and L.Coggins, 1977 — In Vitro Cytotoxicity of Serum and Peripheral Blood Leucocytes for Equine Herpesvirus Type 1 - Infected Target Cells. Am.J.Vet.Res., 38, 117-121

210) Williams,W.T.C., J.L.Melnick and W.E.Rawls, 1969 — Viral Inhibition of the Phytohemagglutinin Response of Human Lymphocytes and Application to Viral Hepatitis. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 130, 652-661

211) Wilson,A.B. and R.R.A.Combs, 1973 — Rosette Formation Between Guinea Pig Lymphoid Cells and Rabbit Erythrocytes, a Possible T-Cell Marker. Int.Arch.Allergy, 44, 544-552

212) Witting,C. und H.Hargans, 1980 — Nachweis der unspezifischen Esterase - ein besserer T-Lymphozyten-Marker als der Spontanrosettentest? Dtsch.Med.,Wschr., 10, 348-349

213) Wizigmann,C., 1978 — Erfahrungen mit einer aktiven Paramunisierung zur Prophylaxe der Crowding Disease bei der Kälber- und Bullenmast. Fortschr.Vet.Med., 28, 51

214) Wybran,J. and H.H.Fudenberg, 1973 — Thymus-Derived Rosette-Forming Cells in Various Human Disease States: Cancer, Lymphoma,Bacterial and Viral Infections, and other Diseases. J.Clin.Invest., 52, 1026-1032

215) Wysocki,L.J. and V.L.Sato, 1978 — "Panning" for Lymphocytes: A Method for Cell Selection. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 75, 2844-2845

216) Wu,L.Y.F., A.R.Lawton and M.D.Cooper, 1973 — Differentiation Capacity of Cultured B Lymphocytes from Immunodeficient Patients. J.Clin.Invest., 52, 3180-3189

217) Yap,K.L., G.L.Ada, I.F.C.McKenzie, 1978 — Transfer of Specific Cytotoxic T-Lymphocytes Protects Mice Inoculated with Influenza Virus. Nature, 273, 238-241

218) Yu,D.T.Y. and C.M.Pearson, 1975 — The Effect of Polycations and Polyanions on Behaviour of Sheep Red Blood Cell Rosettes of Human Lymphocytes. J.Immunol., 114, 788

219) Zander,A.R., N.Boopalam and R.B.Epstein, 1973 — Surface Markers on Canine Lymphocytes. Transplant Proc., 7, 369-373

220) Zeiller,K. and G.Pascher, 1973 — Detection of T and B Cell-specific Heteroantigens on Electrophoretically Separated Lymphocytes of the Mouse. Eur.J.Immunol., 3, 614-618

L E B E N S L A U F

Geboren	am 22. Oktober 1949 in Reutlingen
Vater	Erwin Hechler, Kaufmann
Mutter	Edith Hechler, geb. Braun
Grundschule	April 1956 bis April 196o in Pfullingen
Gymnasium	April 196o bis März 1966 in Pfullingen
Lehre	April 1966 bis März 1969 als Werkzeugmacher in Eningen
Studium	März 1969 bis Juli 1972, Fachhochschule München, Wirtschaftsingenieurwesen Diplom-Wirtschaftsingenieur (FH) Oktober 1972 bis Juli 1973, Technische Universität München-Weihenstephan, Agrarwissenschaften Oktober 1973 bis Februar 1979, Ludwig-Maximilians-Universität München, Tiermedizin
Tierärztliche Prüfung	Juni 1979
Approbation	August 1979
	Seit Februar 1979 Beschäftigung mit vorliegender Dissertation im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin, Tierärztliche Fakultät der Universität München

Herrn Prof. Dr. DDr. h. c. A. Mayr danke ich
für die freundliche Überlassung des Themas
und die stets gewährte Förderung der Arbeit.

Mein ganz besonderer, herzlicher Dank gilt
Herrn Dr. Dr. habil. Peter Thein für seine
ständige, unermüdliche und freundschaftliche
Unterstützung beim Zustandekommen der Disser-
tation. Bei seinen technischen Assistentinnen,
Fräulein Gaby Reggel und Fräulein Eva-Maria Erhard
möchte ich mich sehr für ihre Mithilfe bedanken.